



TESIS DOCTORAL

**Lúpulo (*Humulus lupulus*) y Cerveza; efectos sobre los Ritmos
Sueño/Vigilia y la Ansiedad**

Lourdes Franco Hernández

Departamento de Fisiología

Conformidad de los directores:

Fdo: Carmen Barriga Ibars

Fdo: Javier Cubero Juárez



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

D^ª. CARMEN BARRIGA IBARS, Catedrática de Fisiología de la Facultad de ciencias de la Universidad de Extremadura y D. JAVIER CUBERO JUÁNEZ, Profesor Contratado Doctor del Área de Didáctica de Ciencias Experimentales de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentado por D^ª. Lourdes Franco Hernández, con el título: **“Lúpulo (*Humulus lupulus*) y Cerveza; efectos sobre los Ritmos Sueño/Vigilia y la Ansiedad”** ha sido realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que se encuentra finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para ser juzgada ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Badajoz, a 2 de octubre de 2014

Fdo: Carmen Barriga Ibars

Fdo: Javier Cubero Juárez

Agradecimientos

Este apartado es el más difícil de escribir ya que en unas pocas palabras he de resumir mi agradecimiento a todas las personas que he tenido cerca estos años. Es imposible agradecer lo suficiente a todos los que han prestado su ayuda para elaborar esta tesis que tanto tiempo y esfuerzo ha requerido. Quizá sólo la mitad de los que se merecen aparecer en los agradecimientos estarán aquí, y aun así no podré agradecer a estas personas ni la mitad de lo que querría, y lo que querría será menos de la mitad de lo que ellas se merecen. Para aquellos que no se vean en las siguientes líneas, os digo que todo lo que hicisteis me ayudó mucho. Gracias.

En primer lugar agradecer a mis tutores, los profesores Carmen Barriga Ibars y Javier Cubero Juárez su confianza, consejos, correcciones y sobre todo, su dedicación, ya que son a quienes más tiempo les he robado con la elaboración de este trabajo.

A Ana Beatriz Rodríguez Moratinos y José Antonio Pariente Llanos agradecer su apoyo en cada momento, porque he podido aprender de vosotros mucho, tanto en lo personal como profesional. Gracias por transmitirme vuestra fortaleza y talante en los malos momentos.

A mis compañeros Ana Marchena, María Garrido, Cristina Sánchez, Jonathan Delgado, Cristina Carrasco, Javier Espino, Rafael Bravo, Sergio Paredes, Ignacio Bejarano, David González, Yolanda Castaño y Carmen Galán, gracias por ayudarme, enseñarme, apoyarme, ser buenos compañeros y mejores amigos. No hay palabras que puedan expresar todo lo que sois para mí, sólo espero poder devolveros la mitad de lo que vosotros me dais.

A Elena Cirujano que siempre está ahí para escuchar, no sabes lo que reconforta tu tranquilidad y tu comprensión.

A mis amigas, las que han sufrido las consecuencias colaterales de todo el trabajo, especialmente a Fátima, que ha dormido por mí y ha tenido paciencia de aguantarme tantos años, qué te voy a decir que no sepas ya. Y cómo no a Azu, ya sabes que aunque estemos separadas eres alguien especial para mí.

A mis compañeros y amigos que han estado conmigo estos años Jaime, Cristina, Lorena, Rubén y Carmen porque siempre tendréis en mi mente un maravilloso cajón de recuerdos que no podrán desaparecer nunca.

A Roque, porque ha sido un gran apoyo para mi, por su ayuda en muchos aspectos de esta tesis.

Y por supuesto a mis padres Tomás y Julia. Mamá gracias por estar siempre ahí, por ser tan pesada y tan comprensiva... A ti Papá, porque aunque nosotros no somos muy de demostrarnos cariño, quizá esta sea la excusa para decirte lo que pienso pero que ya sabes. Eres la persona que más admiro de este mundo. Me has transmitido el amor por el trabajo, la lectura, la ganas de estar siempre aprendiendo y superándome; me has enseñado principios, valores... Cosas que no se enseñan ni se aprenden por sí solas sino que se transmiten al poder estar a tu lado cada día.

Gracias a todos

*Para las personas creyentes, Dios está al principio.
Para los científicos está al final de todas sus reflexiones.*

*Max Planck (1858-1947)
Físico alemán*

*Für die Gläubigen, ist Gott am Anfang.
Für Wissenschaftler ist Gott am Ende seine Gedanken.*

*Max Planck (1858-1947)
Deutscher Physiker*

5-HIAA: 5-hidroxi-indolacético	HDL: lipoproteínas de alta densidad
5-HT: Serotonina	HIOMT: Hidroxi-indol-O-metiltransferasa
5-HTL: 5 hidroxitriptofol	HIST: Histamina
5-MIAA: 5 metoxindolacético	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
5-MTL: 5 metoxitriptofol	IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa
AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa	LC: Locus Coeruleus
Acetil-CoA: Acetil coenzima A	LC: Núcleos Catecolaminérgicos
Ach: acetilcolina	MPO: mieloperoxidasa
ACTH: Adrenocorticotropina	NA: Noradrenalina
AFMK: N1-acetil N2-formil 5-metoxiquinurenamina	NADPH: Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
AMK: N ₁ -acetil 5-metoxiquinurenamina	NO: Óxido Nítrico
AMPC: Adenosin monofosfato cíclico	NOS: Óxido Nítrico Sintasa
ATP: Adenosin trifosfato	NPP: Núcleo Pedunculo pontino
CICyS: Centro de Información Cerveza y Salud	NPVL: Núcleo Preóptico Ventrolateral del Hipotálamo
CRF: Corticotropina	NR: Núcleos del Rafe
EBC: European Beer Convention	NR: Núcleos Serotoninérgicos
EEG: Electroencefalograma	NREM: Sueño sin Movimientos Oculares Rápidos
ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno	NSQ: Núcleo Supraquiasmático
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno	NTM: Núcleo Tuberomamilar del Hipotálamo
GABA: γ-aminobutírico	O₂⁻: anión superóxido
GPx: Glutation Peroxidasa	OH⁻: anión hidroxilo
GRd: Glutation Reductasa	ONOO⁻: Anión Peroxinitrito
GSH: Glutation Reducido	OSC: Osciladores Circadianos Centrales
GSSG: Glutation oxidado	REM: Movimientos Oculares Rápidos
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	
HCl: Ácido Clorhídrico	

ROO.: Radical Peroxilo

SAH: S-adenosil homocisteína

SAM: S-adenosil Metionina

SEA: Sociedad Española de Arteroesclerosis

SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria

SGPA: Sustancia Gris Periacueductural

SH-CoA: Coenzima A

SNC: Sistema Nervioso Central

SSRIs: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

TCL: Triglicéridos de cadena Lateral Larga

TCM: Triglicéridos de cadena Lateral Media

TE: Tronco del encéfalo

TPH: Triptófano-5-hidroxilasa

TpH-1: Triptófano hidroxilasa

TPLD: Tegmento pontino laterodorsal

TGI: Tracto gastrointestinal

TRH: Tracto Reninohipotalámico

UEx: Universidad de Extremadura

1. Introducción	1
1.1 Lúpulo	3
1.1.1 Lúpulo y cerveza	3
1.1.2 Historia de la cerveza y componentes de la misma en el	4
1.1.3 Elaboración y clasificación de las cervezas	9
1.1.4 Consumo moderado de alcohol referenciado a la cerveza	11
1.2 Ritmos circadianos: Cronobiología	13
1.2.1 Cronobiología	13
1.2.2 Características de los Ritmos Biológicos	16
1.2.3 Organización y estructuras del sistema circadiano en las Aves: Codorniz Común (<i>Coturnix Coturnix</i>)	17
1.3 El sueño	22
1.3.1 Cronodisrupción	25
1.3.2 Nutrición y su Importancia en el Sueño: Crononutrición	26
1.4 Ansiedad	29
1.5 Sedantes, hipnóticos y ansiolíticos	31
1.6 Neuromoléculas involucradas en el ritmo sueño vigilia y la ansiedad	34
1.6.1 El indol Melatonina	34
1.6.2 El Cortisol	41
1.6.3 Neurotransmisor Serotonina	45
1.7 Lúpulo, cerveza, sueño y ansiedad	51
2. Justificación y Objetivos / Justification and Objectives	53
3. Material y Método / Material and Method	63
4. Discusión General	147
5. Conclusiones / Conclusion	159
6. Bibliografía	163
7. Anexo	213

1. Introducción



1.1 Lúpulo

1.1.1 Lúpulo y cerveza

El lúpulo (*Humulus lupulus L.*) es una planta herbácea, perenne y trepadora. Sus flores masculinas son blancas o blanco verdosas, reunidas en racimos axilares; las flores femeninas son amarillas, axilares, reunidas en cabezuelas en forma de cono o estróbilo, globosas, bracteadas. Presenta un fruto globoso y brillante. Aunque frecuentemente se considera trepadora, no posee zarcillos ni ningún otro apéndice para este propósito, sino que se sirve de robustos tallos provistos de rígidas vellosidades inclinadas abajo. Es una herbácea perenne que puede alcanzar ocho metros de altura, con hojas palmato-lobuladas de 3 a 5 lóbulos dentados. Al ser una especie dioica, las flores femeninas y masculinas surgen en plantas separadas. Las primeras, de color verde claro, se reúnen en amentos y son usadas como saborizante y agente estabilizador en la cerveza. Las masculinas, amarillo verdosas, forman panículas. El fruto se denomina aquenio.

Posee aceites esenciales (hasta un 1 %, sobre todo humuleno, mirceno, β -cariofileno y farnesceno) y más de cien principios de otro tipo, entre ellos geraniol, linolol, citral, linioneno y serolidol, poseyendo también un complejo de resinas amargas (3-12 %) en el que se encuentran: ácido valerónico, lumulona y lupulona. El aceite esencial y las resinas amargas reciben el nombre conjunto de lupulina. El lúpulo contiene 8-prenilnaringenina, el más potente fitoestrógeno conocido (Keiler y cols., 2013).

La resina del lúpulo presenta un mecanismo de acción sobre la modulación de los receptores del neurotransmisor γ -amino butírico (GABA), inhibidor del Sistema Nervioso Central (SNC) (Aoshima y cols., 2006; Zanolli y cols., 2007; Schellenberg y cols., 2004). Este hecho le ha otorgado a la planta del lúpulo un tradicional efecto tranquilizante que principalmente se origina en sus ácidos amargos, en particular su componente alfa ácido: 2-Metil-3-buten-2-ol (Hansel y cols., 1980; Zanolli y Zavatti, 2008; Weeks, 2009; Sánchez y cols., 2010).

El lúpulo posee más efectos tranquilizantes gracias a sus componentes aromáticos, como son el myrcenol (Aoshima y cols., 2006) y xantumol. El efecto

asociado del lúpulo y la valeriana sobre el mecanismo central de la adenosina se ponen de manifiesto en el trabajo realizado en 2004 por Schellenberg y cols. en el cuál se observa cómo a través de los receptores de adenosina inductores del sueño aparece un incremento de las ondas alfa en el electroencefalograma (EEG) (Schellenberg y cols., 2004).

Además el lúpulo y la cerveza contienen lisina, aminoácido esencial con propiedades ansiolíticas a nivel de tracto gastrointestinal (GI) (Smirga y Torii, 2003; Smirga y cols., 2004). A menor graduación alcohólica en la cerveza la concentración de lúpulo y lisina suele ser mayor.

El lúpulo es una planta trepadora, propia de regiones templadas del hemisferio norte. Se emplea desde el siglo IX para fabricar la cerveza por sus propiedades antisépticas. Para ello se escoge la flor, que contiene resinas y aceites aromáticos. Además, del lúpulo fluye la lupulina, sustancia aromática de color amarillo que contribuye a la estabilidad y abundancia de espuma.

1.1.2 Historia de la cerveza y componentes de la misma

Desde tiempos inmemoriales las bebidas fermentadas como el vino, la cerveza y la sidra, se han ligado a la alimentación de muchos pueblos, especialmente a los del área mediterránea. Los primeros antecedentes históricos referidos a la cerveza aparecen datados en el año 4.000 a. C., cuando se encuentran los más antiguos testimonios escritos en caracteres cuneiformes en unas tablillas de arcilla que fueron halladas en Sumeria, (región histórica de Oriente Medio, entre las planicies aluviales de los ríos Tigris y Éufrates) considerada la primera civilización del mundo. En ellos se hacía referencia a una bebida obtenida con granos de cereales fermentados, a la que llamaban *sikaru*, de la que se describían algunas de sus características y efectos, y en las que se revela una fórmula casera de elaboración de la cerveza a partir del pan. Así, éste se cuece, se deshace y se mezcla con agua dejando fermentar la masa hasta conseguir una bebida, siendo por tanto esta receta la más antigua que se conoce. Por todo ello, parece acreditado que los sumerios fueron los primeros que se ejercitaron

en el cultivo de los cereales, e incluso se dice que adoraban a una deidad llamada "Ninkasi" a la que consideraban la diosa de la cerveza.

Desde Oriente Medio, la cerveza se extendió por los países de la cuenca oriental del Mediterráneo. Así, los egipcios, continuando los métodos sumerios, elaboraron una cerveza que bautizaron con el nombre de "zythum" la cual estaba notablemente mejorada. De hecho, los egipcios fueron los primeros que descubrieron la malta y disfrutaron de nuevas características organolépticas de la cerveza, para lo cual le añadieron azafrán, miel, jengibre, comino y otras especias. La cerveza así obtenida tenía diversos sabores, aroma y color para hacerla más atractiva. Durante la primera dinastía egipcia (3.315-3.100 a. C.), la cerveza ya era una bebida muy conocida por aquella avanzada civilización, hallándose restos de cerveza en los yacimientos antropológicos.

Los egipcios tenían la creencia de que fue el dios Osiris quien inventó la cerveza, existiendo incluso una leyenda que cuenta que una leona de gran fiereza iba a acabar con la humanidad y, para salvarla, el dios Ra le dio a beber cerveza roja, que la leona se bebió creyendo que era sangre. Así se aplacó y se convirtió en Hathor, adorada por los egipcios como diosa de la danza, la música y las fiestas. En esta época, la cerveza formó parte de los alimentos utilizados en la búsqueda de placer entre los más acomodados, utilizándose también como parte integrante de los elementos usados para las ofrendas, para el pago de salarios, como auxilio de la medicina, alimento, objeto de recompensas, moneda de cambio, etc. Si no hubiera existido la cerveza, las pirámides seguramente no se hubieran podido construir, ya que los obreros, a causa de la dureza de los trabajos para su construcción, recibían cerveza para hacerles sobrellevar los rigores del calor y de las enormes tareas que tenían que realizar. La cerveza llegó a tener tanta importancia en los tiempos del imperio egipcio, que los ejércitos llevaban sus propias cerveceras con los que confortaban a los soldados tras las duras jornadas guerreras.

La elaboración de esta bebida fermentada está representada en muchas pinturas de las que conforman la decoración de las tumbas, e incluso aparece en el "*Libro de los Muertos*".

En España existen antecedentes que indican su existencia y consumo en tiempos de la dominación romana, siendo conocida con el nombre de "*celia*" antes de que fuera bautizada con el nombre clásico de "*cervisia*" o "*cerevisia*", en una clarísima referencia a Ceres, diosa de la Agricultura, de donde parece haber tomado su actual denominación. La nutrición de un babilonio estaba constituida principalmente de cervezas, granos, frutas, verduras y cebollas, dieta frecuente en la mayoría de la gente modesta de la antigüedad. Muchos salarios se cobraban en grano o directamente en cerveza. La gente con más poder adquisitivo no cambiaron su consumo aunque lo sofisticaron: filtraban la cerveza y la hacían más densa (más cara). Hasta se describe en ésta época cómo los pobres bebían cerveza con cañitas del río, mientras que los ricos disponían de tubos en oro para hacer el mismo servicio. Otro indicio de la importancia social de la cerveza consistió en el hecho de que los elaboradores de cerveza no tenían la obligación de participar en guerras. En cambio, eran obligados a seguir a los ejércitos con tal de asegurarles el avituallamiento del preciado líquido. Como era un alimento de primera necesidad, la cerveza fue, a lo largo de la historia, objeto de diversas codicias por parte de la gente poderosa. De hecho, gravó el comercio con importantes impuestos y se establecieron leyes de uso exclusivo de cereales para favorecer el monopolio de dicho cereal. Incluso se describen algunos enfrentamientos y revueltas en diversos momentos y lugares cuando esta presión se hizo insoportable.

España acoge los restos más antiguos que se corresponde con los hallados en la cueva Can Sadurní en Begues (Barcelona). Se trata de molinos con evidencias de cereal malteado, fechados en el Neolítico Antiguo (del 3.000 a.C.), así como un recipiente cerámico con restos de cerveza. Hasta este descubrimiento, la cerveza más antigua en Europa era la del valle de Ambrona (Soria), con 4.400 años de antigüedad, donde se hallaron restos de cerveza elaborada con trigo en vasijas y otros recipientes que formaban parte de los ajuares funerarios (la cerveza servía para celebrar la vida y acompañar a los seres queridos en su último viaje). Con 3.300 años de antigüedad, Cataluña también posee otra importante referencia: los yacimientos de Genó (Lleida), donde se encontraron residuos característicos de malteado de cebada en una tinaja que datan de la Edad de Bronce (1.200 a.C.).

En Extremadura, esta bebida está presente desde mediados del siglo XVI, cuando Carlos V la importó desde el centro de Europa. Éste monarca, en el año 1555 fija su residencia en el Monasterio Jerónimo de Yuste, ordenando instalar allí, en el año 1556, una cervecería.

La cerveza ha llegado a nuestros días siendo una bebida fermentada, típica y tradicional de la dieta mediterránea, que siempre ha estado relacionada con esparcimiento y ocio. Pero además, en los últimos veinte años se ha demostrado, a través de numerosas investigaciones biomédicas, que la ingesta moderada de cerveza es beneficiosa para la salud. Tal y como explican Anton Piendl y Javier Posada (Piendl, 1998; Posada, 1998.), esta bebida posee beneficios para la salud debido a sus componentes.

- **Lúpulo:** la cerveza es la única bebida que contiene lúpulo, un sedante suave y amargo que estimula el apetito. En las flores femeninas del lúpulo están las denominadas glándulas de lupulina, una resina de color amarillento extraída de los pétalos, que durante el proceso de elaboración de la cerveza se transforma en sustancias amargas. Esta resina contiene ácidos alfa y beta, polifenoles y aceites esenciales, constituyentes naturales que confieren a la cerveza algunas de sus propiedades saludables, entre ellas la antioxidante y la ya mencionada sedante. Su concentración en la cerveza es generalmente de 0.3%. Indicar que generalmente a menor graduación alcohólica, mayor es la proporción de lúpulo (Franco y cols., 2012a; Franco y cols., 2012b).
- **Malta:** proporciona a la cerveza carbohidratos, minerales, elementos trazas, ácidos orgánicos y vitaminas importantes para la vida.
- **Agua:** es el mayor y más importante componente de la cerveza, con 92/100 g. El poder refrescante de la cerveza se debe tanto a su alto contenido en agua como a los minerales que contiene.
- **Contenido de calorías:** cada 100 ml de cerveza contiene entre 30 y 40 kcal.

- **Compuestos proteínicos:** aunque la cerveza es realmente pobre en contenido proteínico, contiene aminoácidos esenciales, como la lisina (12 mg/100 gr de producto) y no esenciales.
- **Minerales y elementos traza:** la cerveza contiene más de 30 minerales entre sus elementos traza, la mayoría de estos se originan en la cebada malteada. Un litro de cerveza satisface casi la mitad de las necesidades diarias de magnesio de un adulto y las necesidades diarias de fósforo y potasio en un 40% y un 20% respectivamente. Así, al ser rica en potasio y baja en sodio, es una bebida diurética.
- **Vitaminas:** la cerveza contiene todas las vitaminas hidrosolubles del grupo B, además de las vitaminas liposolubles A, D y E. Por ejemplo, con 1 litro de cerveza se cubre el 35% de la necesidad diaria de vitamina B6, el 20% de la B2 y el 65% de la B3, niacina. Un litro de cerveza contiene cerca de 210 mg de vitaminas.
- **Gas carbónico:** la cerveza contiene aproximadamente 0,50 g de CO₂ por 100 g de cerveza, lo que proporciona una característica refrescante. Además, el gas carbónico favorece la circulación sanguínea de la mucosa bucal, promueve la salivación, estimula la formación de ácido en el estómago y acelera el vaciamiento del estómago, todo ello favorable para una buena digestión.
- **Polifenoles:** su contenido, del orden de 150-153 mg/l, es relativamente alto. Los polifenoles, que tienen poder antioxidante, son efectivos contra las enfermedades óseas, circulatorias (ya que el consumo moderado de cerveza produce un aumento sérico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), presentando propiedades antiinflamatorio, antitrombótico y antiarteroesclerótico) e incluso intervienen en la lucha contra el cáncer.

El efecto protector que ejerce el consumo moderado de cerveza se ve potenciado cuando el mismo se realiza de forma regular. Sin embargo, el consumo ocasional de cantidades muy elevadas, el denominado *binge drinking*, aumenta el

riesgo de los efectos negativos asociados al alcohol (McElduff y Dobson, 1997; Poikolainen, 1998; Romeo y cols., 2007c).

1.1.3 Elaboración y clasificación de las cervezas

El proceso de elaboración de este alimento consta de varias etapas, la cuales quedan recogidas en la Figura I:



Figura I: Esquema donde se representan los procesos que se llevan a cabo para la elaboración de cerveza.

- **Germinación de la malta:** El grano de cebada, seleccionado, limpiado y humedecido, se extiende en una gran sala llamada cámara de germinación, la cual esta acondicionada de 18-20°C. Enseguida, con ayuda del Galland, aparato formado por dos cilindros, uno metálico exterior y otro interior giratorio de tela metálica, al cual caen las semillas desde una tolva; por un eje interior sale una corriente de aire húmedo. El proceso dura de ocho a nueve días y se interrumpe con una corriente de aire a 25°C que deseca los granos (malta verde). Tras ello se tuestan en hornos especiales a entre 100 y 200°C y se muelen hasta reducirlos a harina.

- **Maceración:** Transformación del almidón en azúcar fermentable, que se realiza entre 60 y 70°C mediante la diastasa y dura unas 3 horas. El agua caliente se añade a las cubas, que tienen agitadores en las que está la harina de malta. Hirviendo el líquido se detiene la acción enzimática, y las proteínas indeseables coagulan y precipitan. Se filtra en una cuba decantadora (lauter), provista de doble fondo agujereado, o bien en filtros prensa. El filtrado, llamado mosto, se hierve en grandes depósitos, en donde se adiciona la cantidad precisa de lúpulo. Se filtra, se enfría y airea.
- **Fermentación:** Se introducen levaduras que se clasifican en:
1) altas: formadas por cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, que suben a la parte posterior del tanque de fermentación (cervezas "ale"). El proceso empieza alrededor de los 9°C; la temperatura asciende unos pocos grados en la fermentación tumultuosa, y finalmente desciende alrededor de 5°C en el enfriamiento. Al cabo de unos días comienza la fermentación lenta, que dura de quince a veinte días, según la fábrica y el tipo de cerveza. 2) bajas: formadas por cultivos de *S. carlsbergensis*, que se depositan en la parte inferior, con temperaturas entre 15 y 20°C (cervezas "Lager").
- **Maduración:** Este proceso consiste en dejar reposar el líquido en tanques especiales durante algunos meses. Para evitar el cambio de gusto se adicionan agentes antioxidantes, ácido sulfuroso o ácido ascórbico. En algunas ocasiones, finalmente se filtra con ayuda de agentes clarificantes.
- **Envasado:** El contenido de anhídrido carbónico se regula en el tanque embotellador. El envasado de la cerveza se realiza en botellas, botes, cubas o barriles, y generalmente se pasteuriza. La cantidad de alcohol oscila del 2 al 6%. Gracias al envasado, la cerveza llega a su destino final con las mayores garantías de conservación, sabor y cuerpo.

La característica diferencial de la cerveza es el extracto primitivo, de la que se deriva el contenido en agua, alcohol, extracto y calorías. En cantidades absolutas, el agua es el componente mayoritario de este producto (Piendl, 1998). A continuación se

muestra la clasificación más aceptada por los fabricantes de los diferentes tipos de cerveza.

- **Cerveza normal:** Se considera a aquella cuyo extracto seco primitivo no llega al 13% en masa.
- **Cerveza especial:** Son aquellas cervezas cuyo extracto seco primitivo se encuentra entre el 13% y el 15% en masa.
- **Cerveza extra:** Cuando el extracto seco primitivo es igual o superior a 15% en masa.
- **Cerveza de bajo contenido en alcohol:** Son aquellas cuya graduación alcohólica se encuentra comprendida entorno al 1% en volumen.
- **Cerveza sin alcohol:** Cuando aparece una graduación alcohólica menor al 1% (0.0 %) en volumen.
- **Cerveza negra:** Obtienen su color del uso de maltas especialmente oscuras durante su elaboración. Para medir la coloración de la cerveza se utilizan las unidades de color EBC (*European Beer Convention*).

1.1.4 Consumo moderado de alcohol referenciado a la cerveza

Según Kalant y Poikolainen (1999), existen al menos cinco contextos que pueden entrar dentro del concepto de consumo moderado:

1. Moderado en el sentido de no tóxico. Se refiere a los efectos del alcohol que pueden resultar inmediatamente nocivos para la salud, como por ejemplo los accidentes de tráfico y los actos violentos. Los factores genéticos y la tolerancia adquirida en relación con el efecto del alcohol llevan a grandes diferencias individuales en la dosis tóxica.

2. Moderado en el sentido estrictamente normal. Es equiparable a la cantidad media que consumen los bebedores de alcohol de una población dada. Con esta

definición no se puede sacar una conclusión en relación a los riesgos asociados al consumo normal en enfermedades crónicas o en relación con problemas sociales.

3. Moderado en el sentido de no perjudicial. Describe principalmente las consecuencias médicas en relación con las enfermedades asociadas al consumo de alcohol.

4. Moderado en el sentido de sin problemas. Engloba, junto con aspectos sanitarios, también parámetros sociales, como relaciones personales, capacidad laboral e incluso antecedentes penales.

5. Moderado en el sentido de óptimo. Se refiere a aquella cantidad de alcohol asociada al menor riesgo de mortalidad en la población.

En dependencia del contexto en el cuál se emplee el término “moderado”, también varía la cantidad de alcohol denominada moderada.

El Centro de Información Cerveza y Salud (CICyS) se refiere a la ingesta moderada como aquella de aproximadamente 10 g de alcohol diarios, lo que equivale a unos 200 ml (1 caña) de cerveza con un contenido alcohólico de entre 4-5°.

En numerosos trabajos científicos publicados por Sánchez y cols., (2010); Romeo y cols., (2007a) y Romeo y cols., (2007b) como “consumo moderado de alcohol” se recomiendan 330 ml/día (1 tercio) para mujeres y 660 ml/día (2 tercios) en el caso de los hombres. Finalmente, la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA), recomienda el consumo de 2 unidades al día (una unidad equivale a 10 g de etanol).

Sin embargo, en numerosos trabajos científicos se indican valores de entre 20 y 40 g, lo que equivaldría a entre 0,50 y 1 l de alcohol diarios, cantidades, estas últimas, elevadas desde nuestro punto de vista (Sánchez y cols., 2010; Romeo y cols., 2007a y Romeo y cols., 2007b).

Por todo lo expuesto, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), incluye en la Pirámide de la Alimentación Saludable –principal referencia en materia nutricional de nuestro país- las bebidas fermentadas (cerveza, vino o sidra) de forma opcional y moderada.

1.2 Ritmos circadianos: Cronobiología

1.2.1 Cronobiología

La vida es un fenómeno rítmico. Etimológicamente Cronobiología (*Kronos*=tiempo; *bios*=vida y *logos*=ciencia) significa “ciencia que estudia los ritmos biológicos”, pero podemos ampliar el concepto aún más diciendo que trata, en definitiva, de los acontecimientos cíclicos.

El estudio de los ritmos biológicos también explora problemas prácticos tales como los efectos del horario de verano, la variabilidad de análisis clínicos, problemas asociados al sueño, dosificación de fármacos, etc. (Córdova-Castañeda y Esquinca-Ramos, 2001). Cuando estudiamos cualquier actividad vital en relación con el tiempo, nos encontramos oscilaciones que indican que estas actividades no se desarrollan de manera continua. Un ritmo biológico se define como una variación oscilante con un periodo constante (Berger, 2004) y tiene carácter hereditario (García-Fernández, 1998). Pueden definirse tres tipos de ritmos biológicos según la variable del tiempo:

- **Ultradiano:** periodo muy inferior a 24 horas (frecuencia cardíaca, electroencefalograma, etc.)
- **Circadiano:** periodo próximo a 24 horas (Ritmo sueño/vigilia, temperatura corporal, etc.) (Takahashi, 1995).
- **Infradiano:** periodo muy superior a 24 horas (ritmos temporales: reproducción, migración, muda, hibernación, etc.)

En general, a un ritmo fisiológico se suele ajustar una función cosenoidal (Cardinali y cols., 1994, Cardinali y cols., 1998a, Cardinali y cols., 1998b; Cardinali y Golombek, 1998; García-Bonacho y cols., 2001) que permite definir las características más importantes de los ritmos biológicos, entre las que destacan la acrofase y el nadir o batifase definidos como los puntos más alto y bajo, respectivamente, de la función en relación a un punto de referencia escogido por el investigador, la amplitud o mitad de la diferencia entre el punto más alto y el más bajo de la curva, y el MESOR (acrónimo de la expresión inglesa *Midline-Estimating Statistic Of Rhythm*) o media ajustada al ritmo, que representa el valor intermedio entre el valor más alto y el más bajo del ritmo ajustado a la función cosenoidal. El funcionamiento correcto de estos

ritmos circadianos endógenos permite a los organismos predecir y anticiparse a los cambios medioambientales, así como adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios (Greene y Siegel, 2004; Gómez-Abellán y cols., 2012). Estos ritmos influyen en la vida de todos los seres vivos, tanto animales como vegetales, y a todos los niveles de organización (Cardinali y cols., 1994).

La doctrina científica de la cronobiología como tal, es bastante reciente pero su concepto lleva varios siglos proyectándose. De hecho, ya en la Grecia antigua, el poeta Hesíodo (año 700 a.C.), escribió: “Las enfermedades caen en los hombres, unas de día y otras de noche”. También Hipócrates solía aconsejar, a los interesados en medicina, investigar las épocas estacionales, para aplicar un tratamiento u otro dependiendo de la estación en la que se encontraran, promovida fundamentalmente por Colin S. Pittendrigh y Jürgen Aschoff, considerados los padres de la cronobiología moderna (Refinetti, 2006). Los ritmos hormonales fueron objeto de interés por parte de la endocrinología durante los años 70 y 80. En seguida la cronopatología despertó el interés por los procesos rítmicos, fisiológicos y fisiopatológicos, asociados a la movilidad y mortalidad en algunas enfermedades vasculares, respiratorias y metabólicas (Ángeles-Castellanos y cols., 2007). Pero no fue hasta la década de los sesenta cuando Halberg estableció las bases de la Cronobiología definiéndola como la disciplina médica cuyo campo de acción es el estudio de los eventos biológicos en relación con el tiempo.

En la medicina china también se le ha dado mucha importancia al concepto de tiempo y periodicidad, tanto que estos son los pilares básicos en la escuela del yin y el yang, considerando los ritmos biológicos dentro de sus diagnósticos y tratamientos a enfermedades de muy diversa índole. Por tanto, prácticamente todas las civilizaciones antiguas han tenido muy en cuenta al tiempo, incluso a veces llegando a relacionarlo con deidades, por ejemplo el Dios del Sol que en el caso de los egipcios era Ra y para los griegos Helios.

Las principales observaciones que se hicieron desde la antigüedad en los ritmos biológicos fueron en plantas. No fue hasta 1729 cuando se realizó el primer experimento cronobiológico. Lo llevó a cabo un astrónomo llamado Jean Jacques

d'Órtus de Mairan, el cual pudo observar y explicar la existencia de ritmos biológicos endógenos aplicados al movimiento de apertura y cierre de las hojas, abiertas durante el día y cerradas durante la noche y que presumiblemente se debían a un reloj endógeno (Pittendrigh, 1960). Esta situación se mantenía incluso en condiciones de oscuridad permanente. Propuso que esto se asemejaba a cuando las personas, aún sin saber la hora del día que era, mantenían un patrón de sueño relativamente regular.

En la segunda década del siglo XIX, el médico alemán Christoph Hufeland describió que en todas las enfermedades aparece un periodo regular, y esto se debía a nuestra cronobiología natural.

En definitiva, el ser humano está inmerso en un ambiente que posee una serie de ciclos rítmicos repetitivos (Córdova-Castañeda y Esquinca-Ramos, 2001). El nivel de rendimiento orgánico, los estados patológicos, las características farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como la eficacia de los medicamentos, son solo algunas de las circunstancias que se modifican en función de diversos ciclos temporales. De la misma manera, estos ciclos influyen en casi la totalidad de los procesos fisiológicos (temperatura corporal, secreción hormonal, periodos reproductores, floración y germinación, funciones cardiovasculares y digestivas) y comportamentales (ciclo sueño/vigilia, periodos de actividad y reposo, alimentación y excreción, percepción sensorial, aprendizaje y memoria) fluctuando rítmicamente con una periodicidad característica (Refinetti, 2006; Cambras Riu, 2006). Este fenómeno de ritmicidad se extiende a todos los seres vivos, animales o vegetales, y a todos los niveles de organización (molecular, celular, tisular y orgánico) (Sanvisens, 1989; Moore, 1999; Tellería, 1987). Con todo esto, podemos decir entonces que la ritmicidad es parte de nuestra vida, que todo organismo está sujeto a alguna forma de periodicidad y que los ritmos, de alguna manera, tienen algún componente geofísico en el ambiente (Ángeles-Castellanos y cols., 2007; Esquifino y cols., 1999a, Esquifino y cols., 1999b; Pazo, 2002).

1.2.2 Características de los Ritmos Biológicos

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 (Barriga y cols., 2004; Morris y cols., 2012). La regulación del ciclo sueño/vigilia se encuentra estrechamente vinculada con los ritmos circadianos de temperatura corporal y secreción de melatonina. Así por la noche, cuando disminuye la actividad y la iluminación, se produce un descenso en la temperatura corporal acentuado por el inicio de la secreción de melatonina, la cual induce la entrada en la fase de sueño mediante la inhibición de los mecanismos que generan el período circadiano de vigilia. Sin embargo, por la mañana, el descenso en los niveles circulantes de melatonina como consecuencia de la iluminación ambiental inducen un aumento de la temperatura corporal y, en consecuencia, la transición hacia el periodo de vigilia (Cagnacci, 1997), hechos corroborados tanto en aves (Paredes y cols., 2009a) como en humanos (Markwald y cols., 2010).

En general, los ritmos circadianos presentan tres características fundamentales (Refinetti, 2006; Cambras, 2006):

1) Poseen carácter endógeno, es decir, persisten en el organismo en ausencia de estímulos ambientales con un periodo cercano a 24 horas. La organización temporal de procesos fisiológicos internos y de eventos bioquímicos celulares es fundamental ya que muchos de ellos son dependientes entre sí y no solo necesitan un espacio común, sino simultaneidad en el tiempo. Por ello, es importante el carácter endógeno de los ritmos independientemente de las fluctuaciones ambientales.

2) Se pueden sincronizar a condiciones ambientales rítmicas diarias, permitiendo a los organismos experimentar adelantos o retrasos en sus ritmos endógenos para estar sincronizados con el medio externo. Esta sincronización se da por la participación de "relojes externos" denominados *zeitgebers* (zeit=tiempo y geber=dador, marcador) cuyas funciones son, precisamente, sincronizar la actividad cerebral y los ritmos endógenos con el medio ambiente circundante. Así, tanto el SNC como el periférico (Warren y Casone, 1995; Cardinali y cols., 1996a, Cardinali y cols.,

1996b, Cardinali y cols., 1998a; Cardinali y cols., 1998b), el endocrino (Casanueva y cols., 1984; Cai y Wise, 1996; Selgas y cols., 1998; Esquifino y cols., 1999b, Esquifino y cols., 1999c; García-Bonacho y cols., 2000; Cano y cols., 2001) y el inmunitario (Ratajczak y cols., 1992; Bourin y cols., 1993; Esquifino y cols., 1996; Cardinali y cols., 1998a, Cardinali y cols., 1998b; Castrillón y cols., 2000; Labunet's, 2001; Barriga y cols., 2004, Barriga y cols., 2006) muestran variaciones diarias.

3) Tienen la capacidad de compensar los cambios de temperatura, es decir, si se miden las características del ritmo bajo distintas temperaturas ambientales, los cambios del periodo serán mínimos.

Los relojes circadianos dotan a los organismos de un grado de sincronización interna, pero esta sincronización puede verse alterada por factores como el envejecimiento. Así, el proceso de envejecimiento produce una situación de desajuste cronobiológico que se traduce en acortamiento del periodo oscilador y de la amplitud, pérdida del ritmo circadiano, aparición de un patrón ultradiano y desincronización interna (Copinschi y cols., 1999; Gibson y cols., 2009). Además, la desincronización entre las señales procedentes del medio ambiente externo y las señales del medio interno del organismo son alteraciones comunes asociadas al envejecimiento (Cano y cols., 2001; Biello, 2009). Por otra parte, la actividad de las vías aferentes y eferentes del reloj endógeno se alteran en la vejez, con el consiguiente deterioro de las funciones fisiológicas circadianas (Kondratova y Kondratov, 2012).

1.2.3 Organización y estructura del sistema circadiano en las Aves: codorniz común (*Coturnix coturnix*)

La codorniz común (*Coturnix coturnix*) (Figura II) es una de las aves del Orden Galliformes (*Familia Phasianidae*) más pequeñas (longitud 16-18 cm; envergadura 32-35 cm.). Está ligada a los medios abiertos de la Península y ambos Archipiélagos, desde las llanuras cerealistas hasta las amplias extensiones desarboladas de los páramos, nidificando entre las hierbas, a menudo en medio de los sembrados. Este migrante de largo recorrido y complejos patrones migratorios presenta un alto potencial reproductivo con el que compensa las numerosas bajas que sufre a manos de los

depredadores. Su aspecto es similar a las perdices jóvenes. Posee un plumaje críptico, de color terroso con estriado pardo oscuro, blanco y crema. Presenta ceja blanca prominente y garganta pálida, blanca en hembras y jóvenes, y con un ancla oscura en los machos, aunque bastante variable en estos. Muy terrestre, en vuelo destacan sus alas alargadas y el aleteo rápido a poca altura del suelo. Su alimentación está compuesta principalmente de semillas silvestres y de invertebrados.



Figura II: Codorniz común (*Coturnix coturnix*)

El sueño en aves es similar al de humanos (diurnos y monofásicos) ya que el grupo de las aves comparten un origen filogenético con mamíferos y reptiles. Algunos autores concluyen que la activación cerebral característica del sueño REM (Rapid Eye Movement), se desarrolló independientemente en las aves y en los mamíferos térios (subclase de mamíferos que se caracterizan porque el embrión se alimenta a través de una placenta) como los marsupiales y placentarios. Esta fase de sueño lento está presente tanto en aves como en los tres grupos de mamíferos pero no en reptiles con los que comparten un origen filogenético común. Tanto es así que la mayoría de

estudios relacionados con el sueño se han llevado a cabo en animales vertebrados endotérmicos (aves y mamíferos) (Ayala-Guerrero y Mexicano, 2008).

La alternancia de los ciclos biológicos está regulada por un sistema circadiano, definiéndose éste como el conjunto de estructuras que organizan los ritmos de determinados procesos fisiológicos. Está constituido por el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), el marcapasos endógeno, típico de mamíferos y aves, capaz de producir oscilaciones por sí solo con una frecuencia cercana a las 24 horas, un componente visual que recibe la información de las señales externas y la conduce hasta el reloj endógeno y vías eferentes que acoplan el marcapasos con los sistemas efectores que producen los ritmos. La ritmicidad de algunos elementos del sistema (como por ejemplo, el NSQ o la glándula pineal) va disminuyendo con la edad al ir fallando los elementos del resto del sistema, lo cual es consecuencia de la reducción o desacoplamiento de los múltiples osciladores que constituyen los marcapasos de este sistema. Como consecuencia, los ritmos circadianos manifiestan importantes cambios con el envejecimiento, como son acortamiento del periodo del oscilador, pérdida del ritmo circadiano, aparición de un patrón ultradiano y desincronización interna, lo que provoca determinados trastornos que aparecen en la vejez (Copinschi y cols., 1999).

El sistema circadiano de las aves está constituido por el órgano pineal, el NSQ del hipotálamo y los ojos, elementos que se encuentran unidos entre sí mediante vías neurales y conexiones hormonales, lo que permite la actuación conjunta de los mismos de manera coherente, de tal forma que los marcapasos centrales controlan y coordinan jerárquicamente el comportamiento de los múltiples osciladores o relojes periféricos, existiendo además múltiples entradas fóticas (Underwood y cols., 2001). Así el modelo general de organización circadiana en las aves queda establecido por Osciladores Circadianos Centrales (OSC), localizados probablemente en el área supraquiasmática, y periféricos situados en la pineal y los ojos, cuyo encarrilamiento se produce directamente mediante la luz en dichas estructuras. Además, la luz puede encarrilar el sistema central a través de receptores extrarretinales del cerebro y fotorreceptores ubicados en la pineal y los ojos, siendo las uniones al sistema de estos últimos órganos vía la hormona melatonina, o alternativamente en el caso de los ojos vía el tracto retinohipotalámico (TRH) (Figura III).

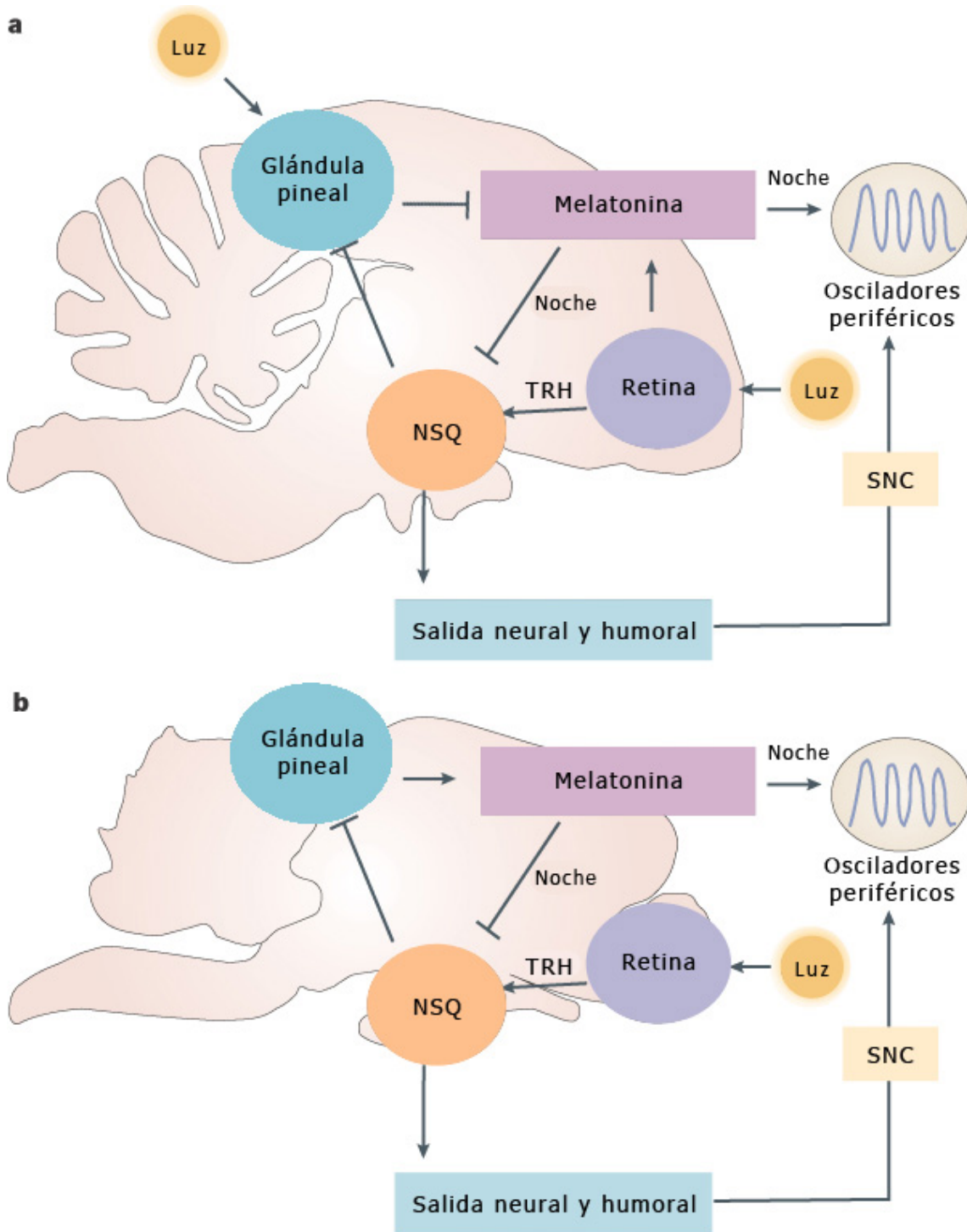


Figura III. Estructura y regulación del sistema circadiano. a) Aves. b) Mamíferos. SCN: Sistema Nervioso Central; TRH: Tracto Retinohipotalámico; NSQ: Núcleo Supraquiásmático (tomada de Bell-Pedersen y cols., 2005).

Regulación en la secreción de melatonina

La producción de melatonina está sometida a un ritmo circadiano similar en aves y mamíferos (Collin y cols., 1989; Cassone y Natesan, 1997). No obstante, existen importantes características en los pinealocitos aviarios que los hacen muy diferentes a los pinealocitos de la glándula pineal mamífera, ya que los pinealocitos aviarios son directamente fotosensibles. Así en las aves, la activación pinealocítica ocurre en la fase de luz a través de receptores α_1 , α_2 y β -adrenérgicos, lo que causa un descenso en el contenido de AMPc, inhibición de la actividad Arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) y disminución de la liberación de melatonina (Zatz y Mullen, 1988; Collin y cols., 1989), mientras que en mamíferos la estimulación noradrenérgica se realiza vía receptores α_1 y β -adrenérgicos durante el periodo de oscuridad, lo que produce el aumento de los niveles de AMPc dentro de la célula y la consecuente activación de la enzima AA-NAT, aumentando así la producción de la hormona pineal (Vacas y cols., 1985; Takahashi y cols., 1989) (Figura IV). A pesar de las diferencias mencionadas, tanto en mamíferos como en aves, y en el resto de vertebrados, la magnitud y duración del incremento nocturno de la síntesis de melatonina va a depender de la longitud de la fase oscura del ciclo fotoperiódico, actuando como “reloj” y “calendario” para la regulación de otras actividades biológicas, independientemente de que la actividad del animal sea diurna o nocturna, considerándose de este modo como mensaje de la oscuridad y no del descanso o periodo de sueño (Illnerova y cols., 2000).

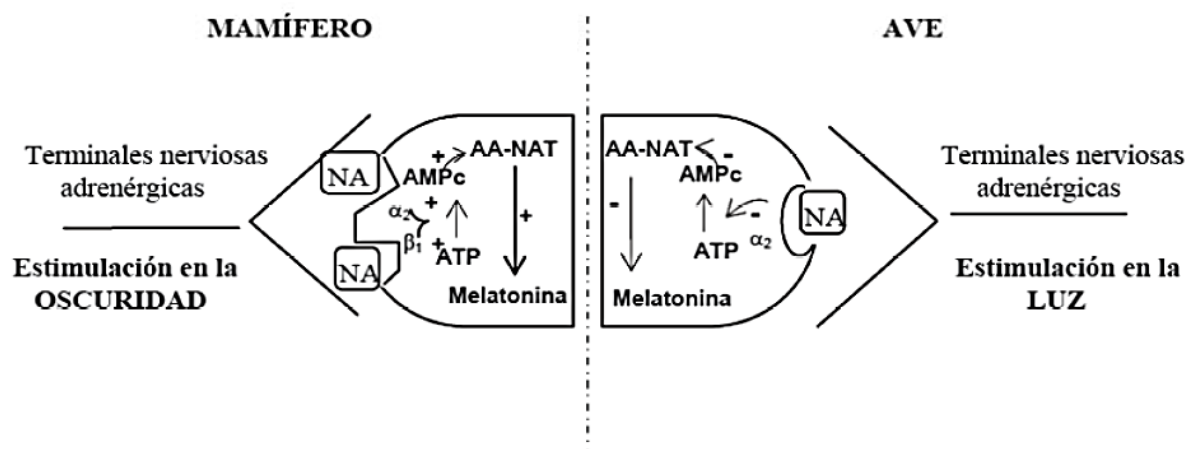


Figura IV: Regulación adrenérgica de la síntesis de melatonina en pinealocitos de mamíferos y aves. AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; ATP: adenosín trifosfato; NA: adrenalina.

1.3 El sueño

Podemos decir que ya a finales del siglo XIX, Gayet, en Francia, observó lesiones del mesencéfalo en una autopsia de un caso de letargia crónica. Más conocidos son los hallazgos de Von Economo (Von Economo y En Brodal, 1981), que describe en la I Guerra Mundial, lesiones del hipotálamo posterior y del mesencéfalo rostral en casos de encefalitis letárgica. Son clásicos los trabajos de Bremer y Cerveau (1935) en los años treinta del siglo XX, en que secciona el sistema nervioso central del gato, entre bulbo y médula ("encephale isolé"), y observa alternancias del sueño y la vigilia. Pero si la sección era más craneal ("cerveau isolé"), el animal entraba en un estado de sueño total. En base a los experimentos, Bremer afirmaba que lo que provocaría el sueño sería una desaferentización del sistema nervioso central, una interrupción de las vías ascendentes.

A principios del siglo XX, Claparède (1905) sugirió que el sueño era provocado por una intoxicación del organismo. Partidarios de esta teoría fueron Hess y Moruzzi, así como Piéron, anteriormente a Claparède. Pavlov, en 1923 aplica su teoría del reflejo condicionado a la explicación de los fenómenos del sueño. Realmente es Von Economo (1923) quien defiende la existencia de centros neurales responsables de la mecánica del sueño: habla de un centro situado en el hipotálamo posterior y porción rostral del mesencéfalo, cuya lesión produce hipersomnolencia y estupor; y de un centro situado en hipotálamo anterior, para los estados de sueño. Hess (1944) confirmó las hipótesis de von Economo, pero con una salvedad, realmente era el tálamo el que contenía el verdadero centro del sueño, ya que la estimulación de su zona anteromedial (a baja latencia) producía estado de sueño. La invención del electroencefalograma por parte de Berger (1930), inicia una nueva era en el estudio de los mecanismos de la vigilia y el sueño. Gracias a estos progresos pueden explicarse los trabajos de Bremer (1935), y en este sentido, también son clásicos los trabajos de Magoun y Rhines (1946) y de Moruzzi y Magoun (1995), que llevan a concluir que la formación reticular caudal tendría que ver con el estado de sueño, y la craneal, con el de vigilia, correspondiéndose asimismo con datos obtenidos por Rhines y Magoun (1946), referidos a la influencia de la formación reticular sobre las neuronas motoras de la médula. En la década de los cincuenta, Aserinsky y Kleitman (1953) y su grupo

Dement y Kleitman en 1957 y Dement y Wolpert en 1958, describen la etapa del sueño REM, en la que hay una inhibición del tono muscular, según demostrara por esos años Jouvett, así como una “paradójica” desincronización electroencefalográfica. Jouvett (1962) pensaba que el centro responsable del mecanismo ejecutor del sueño REM era la porción rostral de la formación reticular pontina oral. Jouvett fue el que bautizó al sueño REM como sueño paradójico. Sin embargo, De la Roza y Reinoso (2000) han demostrado con gran precisión que el centro que regula, como “director de orquesta”, la fase de sueño REM, se halla en la región ventral paramediana de la formación reticular pontina oral, zona por otra parte importante en la regulación de movimientos oculares complejos.

Es en los años 80 del pasado siglo cuando se empieza a sospechar de la importancia del tálamo en los fenómenos del sueño. En este sentido, son cruciales los trabajos de Villablanca y col., (2001) que observan cómo el gato diencefálico (en que la corteza cerebral era ablacionada) presentaba la misma patología que el gato atalámico. Por ello, Villablanca pensó en la importancia de los circuitos corticotálamicos en la regulación del sueño. Por esa época, Steriade (1991) demuestra la importancia del núcleo reticular del tálamo en la generación de espigas en el sueño.

Fisiología del sueño

La vigilia y el sueño oscilan de forma cíclica cada 24 horas aproximadamente (ritmo circadiano). Las fases Sueño sin movimientos oculares rápidos (NREM) y REM del sueño también oscilan cíclicamente con periodicidad ultradiana (inferior a las 24 horas) (Carskadon y Dement, 1994; Borbély, 1994). En adultos jóvenes, el 75% de la noche se compone de sueño NREM (Quichou y Pévet, 1992) y un 25% de sueño REM. Con la edad, y de forma paralela a la pérdida de neuronas del NSQ (Iguichi y cols., 1982), se modifican los patrones de sueño: disminuye marcadamente el sueño de ondas lentas, aumentan los despertares nocturnos y las siestas diurnas, y se instaura un patrón de fase de sueño avanzada (Bliwise, 1994).

Los sistemas neuronales que controlan la alternancia cíclica de la vigilia y el sueño están contenidos en la formación reticular del tronco del encéfalo (TE), hipotálamo y cerebro basal, con núcleos de relevo en el tálamo y con la corteza como órgano diana. La vigilia es mantenida por el sistema de alerta o arousal, que tiene su

origen en distintos núcleos de la formación reticular: *locus coeruleus* (LC), que contiene neuronas noradrenérgicas; núcleo pedunculopontino (NPP) y tegmento pontino laterodorsal (TPLD), que contienen sobre todo neuronas colinérgicas; y núcleos del rafe (NR), que contienen neuronas serotoninérgicas (Pace-Schott y Hobson 2002; Steriade, 1996; Saper y cols., 2001; Mignot y cols., 2002; Maquet 1999). Estos núcleos mantienen una actividad tónica en vigilia, reforzada por las aferencias sensitivas. Este sistema tiene dos circuitos (Figura V):

- Uno de ellos se origina en los núcleos colinérgicos (NPP y TPLD) y se dirige hacia distintos núcleos talámicos inespecíficos, de donde parte el sistema de proyección difusa talamocortical, que transmite toda la información sensorial hacia la corteza.
- El otro se origina en los núcleos catecolaminérgicos (NLC) y serotoninérgicos (NR), continúa por la sustancia gris periacueductal (SGPA) y atraviesa el hipotálamo lateral. En este punto se unen también proyecciones histaminérgicas procedentes del hipotálamo posterior (núcleos tuberomamilares) y las propias proyecciones que se originan en las neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral, para, todas ellas, junto con el circuito anterior, proyectar hacia la corteza de la totalidad de los hemisferios cerebrales.

El hipotálamo posterior y todos estos núcleos del TE están, por tanto, muy activos en vigilia. Pero también el hipotálamo posterior, así como los núcleos catecolaminérgicos, serotoninérgicos y la SGPA, forman parte de un circuito neural involucrado en el control antinociceptivo. Vemos, por tanto, que los sistemas que intervienen en los mecanismos fisiológicos del sueño tienen relación con los que intervienen en el control del dolor.

Durante la transición de la vigilia al sueño NREM, disminuye la actividad en la mayoría de las neuronas del neuroeje. Bajo la influencia de señales homeostáticas y circadianas procedentes del hipotálamo, cesa la acción estimuladora hacia la corteza procedente de los núcleos intralaminares talámicos, es decir, cesa la actividad en las proyecciones difusas talamocorticales. El sueño resulta de la inhibición de las células hipotalámicas histaminérgicas, de la activación del hipotálamo anterior (que produce

sueño) y de la disminución de la actividad talamocortical (Pace-Schott y Hobson, 2002; Steriade, 1996; Saper y cols., 2001).

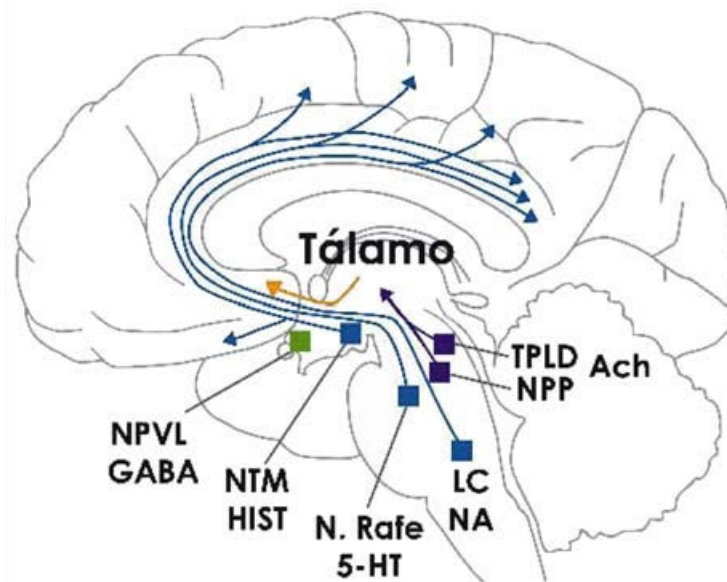


Figura V: Sistemas neuronales de mantenimiento de la vigilia (modificado de [47]). 5-HT: serotonina; Ach: acetilcolina; GABA: ácido γ -aminobutírico; HIST: histamina; LC: locus coeruleus; NA: noradrenalina; NPP: núcleo pedunculopontino; NPVL: núcleo preóptico ventrolateral del hipotálamo; N. rafe: núcleos del rafe; NTM: núcleo tuberomamilar del hipotálamo; TPLD: tegmento pontino laterodorsal (Tomado de Caminero-Rodríguez y Pareja, 2008).

1.3.1 Cronodisrupción

La Cronodisrupción o interrupción circadiana se define como una importante perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y comportamentales. También podría definirse como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (Erren y Reiter, 2009).

La cronodisrupción puede verse debida a varias situaciones, como el jet-lag, trabajo por turnos o el consumo inadecuado de determinados alimentos, que actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la percepción de los ritmos internos y externos (Buijs y Kreiter, 2006; Pérez, 2003; Caspi, 2004; Sack y cols., 2007; Petrie y cols., 1989; Skene y cols, 1999; Takahashi y cols., 2002).

Un mal funcionamiento de este complejo sistema (cronodisrupción) aumenta el riesgo de desarrollar patologías. En la sociedad moderna, factores como el estrés, desorden en los horarios, o falta de sueño entre otros, producen interrupciones en el sistema circadiano que se asocian con el reciente aumento de enfermedades como envejecimiento prematuro, obesidad, hipertensión, diabetes y cáncer (Gómez-Abellan y cols., 2012).

1.3.2 Nutrición y su Importancia en el Sueño: Crononutrición

El comportamiento alimentario constituye el primer elemento a considerar dentro del proceso de la nutrición de los organismos. La gran mayoría de los estudios realizados se han centrado en explicar cómo tiene lugar la regulación homeostática del mismo (regulación de la cantidad y calidad del alimento ingerido), siendo el hipotálamo la principal estructura neural implicada y actuando en estrecha coordinación con la liberación de hormonas como la colecistoquinina, la leptina, la grelina y la insulina. Sin embargo, los aspectos temporales de dicha regulación han sido mucho menos estudiados. En los animales omnívoros, esta regulación no solo se reduce a determinar cuándo comer, sino que también el tipo de alimento (macronutriente) constituye una variable regulada temporalmente. Además, la mayoría de los factores neuroendocrinos implicados en la ingesta, así como la digestión, absorción de nutrientes, enzimas clave del metabolismo y gasto energético, siguen un ritmo circadiano. Estos ritmos son los responsables de que un determinado nutriente no sea metabólicamente aprovechado del mismo modo a una u otra hora del día (López y cols., 2006). Por tanto, el momento del día en el que se ingiera un alimento va a ejercer una influencia directa sobre la circulación de determinados factores metabólicos y hormonales como son la glucosa, los ácidos grasos libres, los glucocorticoides o las hormonas tiroideas, entre otros (Escobar y cols., 2009).

Las primeras observaciones cronobiológicas en relación con la nutrición y alimentación se remontan al siglo XVII con los experimentos de Sanctorius, científico que llevó a cabo el primer estudio de autorritmometría conocido. Sanctorius fue el primero que puso de manifiesto la influencia que tiene la alimentación sobre los

ritmos biológicos y, por tanto, quien sentó los cimientos para el desarrollo de estudios posteriores que desembocaron en lo que actualmente conocemos como crononutrición. Esta ciencia basa sus principios en el estudio de la organización temporal de los procesos implicados en la nutrición y alimentación de los organismos, y en la influencia que la alimentación tiene sobre los ritmos biológicos. Por tanto, la crononutrición establece que no solo el contenido de los alimentos, sino también el momento de su ingestión, junto con los efectos interactivos de los componentes nutricionales, son los que contribuyen de forma natural al correcto funcionamiento del sistema circadiano y, además, determinan la efectividad de cualquier régimen alimentario.

La dieta ejerce un papel esencial en la regulación del ciclo sueño/vigilia. Los principales factores dietéticos que promueven el sueño ejercen su acción a través de distintas vías: activando o favoreciendo la circulación intestinal de hormonas, activando las neuronas GABAérgicas o serotoninérgicas, o mediante la estimulación de la síntesis de melatonina y/o serotonina, aunque no se descarta la actuación de otros mecanismos hasta el momento no identificados (Peuhkuri y cols., 2012).

Existen nutrientes que están estrechamente relacionados con la vigilia y nutrientes relacionados con el sueño (Peuhkuri y cols., 2012). Dentro del primer grupo se encuentran las vitaminas del grupo B y las vitaminas antioxidantes. Las vitaminas del grupo B se concentran en la carne, especialmente la de pavo, en pescados como el atún, en frutas como el plátano o en legumbres como las lentejas. En relación a las vitaminas antioxidantes (principalmente, vitamina C, E y β -caroteno), numerosas frutas como el mango, el kiwi o la frambuesa, frutos secos como las nueces, y muchas verduras, han demostrado ser ricos en al menos uno de estos tres nutrientes (USDA, 2012; Liu, 2003; Xu y cols., 2010). En individuos sanos, la vitamina B₁₂ (cobalamina) mejora la alerta y la concentración y reduce la fase de sueño durante el día (Mayer y cols., 1996). Por su parte, las vitaminas antioxidantes pueden ejercer un efecto estimulante de la actividad diurna, por lo que se consideran que actúan favoreciendo la instauración del ritmo circadiano sueño/vigilia (Poeggeler, 2005). Finalmente señalar que las carnes, especialmente las rojas, son ricas en el aminoácido tirosina precursor de las catecolaminas, hecho que hace que la ingesta de las mismas sea aconsejable

ingerirlas por la mañana. En este campo, nuestro grupo de investigación ha observado el consumo de fruta fresca o procesada refleja la acción beneficiosa tanto en animales de investigación como en humanos (Reiter y cols., 2005; Nagata y cols., 2005; González-Flores y cols., 2011; González-Flores y cols., 2012; Garrido y cols., 2010; Delgado y cols., 2012; Rafter, 2002.).

En el grupo de los nutrientes relacionados con el sueño, encontramos los triglicéridos de cadena media (TCM), el indol melatonina y sus precursores, el aminoácido triptófano y el neurotransmisor serotonina. Respecto al primer componente, se ha demostrado que la relación entre los TCM y los triglicéridos de cadena larga (TCL) en la dieta de los recién nacidos puede modificar ciertas funciones fisiológicas entre las que se encuentra el sueño (Telliez y cols., 2002). Del mismo modo y en relación a las alteraciones del sueño en las etapas más tempranas de la vida, se ha comprobado que leches infantiles enriquecidas con triptófano favorecen el sueño de estos niños (Cubero y cols., 2006a, Cubero y cols., 2006b; Cubero y cols., 2006c; Cubero y cols., 2007). Además, trabajos realizados por Bravo y cols., (2012) ponen de manifiesto que en las etapas tardías de la vida, es decir en la tercera edad, la toma de alimentos ricos favorecedores del sueño, como es el caso de cereales enriquecidos en triptófano, son capaces de actuar sobre la cronodisrupción del sueño/vigilia propia de la edad (Paredes y cols., 2009c).

Deficiencias en vitaminas del grupo B, y de determinados minerales, pueden perturbar la regulación del sueño. Estos efectos parecen estar basados en la influencia que ejercen estas vitaminas sobre la secreción de melatonina, indol pineal con importantes propiedades cronobióticas. En concreto, la vitamina B₁₂ contribuye a la producción de melatonina (Hashimoto y cols., 1996). En base a esto, el tratamiento con diferentes dosis de vitamina B₁₂ ha demostrado ejercer efectos beneficiosos sobre el ciclo sueño/vigilia y sobre el síndrome de la fase de sueño retrasado tanto en sujetos sanos (Dodson y Zee, 2010) como con enfermedad de Alzheimer (Ito y cols., 2001). Por otro lado, la administración de vitamina B₃ (niacina) incrementa el sueño REM en individuos con un patrón de sueño normal y mejora la eficiencia del sueño en sujetos con insomnio moderado (Robinson y cols., 1977). En el organismo, la síntesis de vitamina B₃ se produce a partir del aminoácido triptófano, a través de la vía anabólica

del metabolismo de dicho aminoácido que está mediada por la formación de quinurenina. Por ello, muchos investigadores especulan con la posibilidad de que la administración directa de vitamina B₃ pueda reducir la cantidad de triptófano convertida a esta vitamina, aumentando la disponibilidad de este aminoácido esencial para la síntesis de serotonina y melatonina. Por su parte, la vitamina B₆ (piridoxina) es necesaria para la formación de serotonina a partir de triptófano (Allen y cols., 2009). Por tanto, una deficiencia de vitamina B₆ puede afectar a los niveles circulantes de serotonina (Hussain y Mitra, 2000) y, por tanto, al ciclo sueño/vigilia.

En relación con los minerales implicados en el proceso regulatorio del sueño, el magnesio constituye uno de los ejemplos más representativos ya que incrementa la secreción de melatonina desde la glándula pineal mediante la estimulación de la actividad de la enzima serotonina *N*-acetil-transferasa (AA-NAT), enzima clave para la síntesis de melatonina (Durlach y cols., 2002).

1.4 Ansiedad

El término ansiedad proviene del latín “*anxietas*”, que significa angustia, aflicción, y consiste en un estado de agitación, inquietud o zozobra del ánimo. Dicha angustia suele acompañar a muchas enfermedades, y no permite sosiego a los enfermos.

Todas las personas sienten un grado moderado de ansiedad, siendo ésta una respuesta psicológica frente al estrés. Pero el término ansiedad se aplica a la combinación de distintas respuestas mentales que no son atribuibles a peligros reales, sino que se presentan ya sea en forma de crisis, o bien, como un estado persistente y difuso, pudiendo llegar al pánico. La ansiedad se relaciona con la anticipación de peligros futuros, indefinibles e imprevisibles. Si la ansiedad supera la normalidad en cuanto a los parámetros de intensidad, frecuencia o duración, o bien se relaciona con estímulos no amenazantes para el organismo, provoca manifestaciones patológicas en el individuo, tanto a nivel emocional como funcional (Miguel, 1996).

Existe una gran variabilidad interindividual en cuanto al rasgo de ansiedad; así, algunos sujetos tienden a percibir un gran número de situaciones como amenazantes, mientras que otros no le conceden mayor importancia. Ésta es vivida por el individuo como patológica en un momento particular. Cuando las circunstancias son percibidas como amenazantes por el sujeto, la intensidad de la emoción aumenta independientemente del peligro real. Cuando las mismas son valoradas como no amenazantes, la intensidad de la emoción será baja, aunque exista dicho peligro real. La relación entre ambos puntos de vista es muy estrecha, pues un individuo con alto rasgo de ansiedad reaccionará con mayor frecuencia de forma ansiosa (Miguel, 1996).

Como resultado del padecimiento de esta ansiedad se presentan ciertas manifestaciones fisiológicas particulares, como sudoración, tensión muscular, quejidos, pulso acelerado, respiración entrecortada, indigestión, diarrea o disfunción sexual, entre otras. El individuo trata de buscar una solución al peligro, por lo que el fenómeno es percibido con total nitidez (Ramírez y cols., 1996; Gil-Monte y Peiró, 1997; Ferrer, 2002).

El estrés laboral debe ser considerado como el resultado de la relación o transacción entre el individuo y el entorno laboral. En ese sentido, y de acuerdo con autores como Lazarus y Folkman (1986), el estrés laboral se produce cuando la persona considera que las demandas laborales superan o exceden sus recursos de adaptación a esa situación. En consecuencia, el estrés laboral hace referencia a un proceso de interacción complejo determinado por las características del trabajador y del ambiente laboral. Entre los diferentes tipos de efectos negativos debidos al estrés, uno de los más contemplados en la actualidad es el síndrome de burnout o de “estar quemado” con el trabajo (Bernardo y Labrador-Encinas, 2006). Varios autores han tratado de definir el proceso por el que el estrés puede llevar al burnout. Para Cherniss (1980), se trata de un proceso de acomodación psicológica progresiva entre un trabajador estresado y un trabajo estresante, distinguiendo varias etapas: a) una fase de estrés caracterizada por un desajuste entre las demandas laborales y los recursos del trabajador, b) una fase de agotamiento al producirse de forma crónica respuestas de preocupación, tensión, ansiedad y fatiga, y c) una última etapa de agotamiento

defensivo, en la que se aprecian cambios en las actitudes y en la conducta, como la robotización y el cinismo.

Centrándonos en el trabajo que se presenta, la ansiedad prolongada puede desembocar en aquellas personas que la padecen en el *Síndrome de Desgaste Profesional*, y puede afectar tanto a la salud física como a las relaciones sociales de los trabajadores que la padecen (Grau y cols., 2005). Se ha observado en los afectados, un cierto cansancio físico y emocional, tensión, ansiedad y limitación en las relaciones personales en el ámbito laboral con una disminución de la eficacia y la eficiencia, absentismo y mengua de la calidad asistencial cuando se trata de personal sanitario (Ramírez y cols., 1996; Gil-Monte y Peiró, 1997; Ferrer, 2002).

Respecto al estrés académico presentado por los universitarios, hay escasos trabajos que hayan demostrado la existencia de índices notables de estrés en las poblaciones universitarias, alcanzando mayores cotas en los primeros cursos de carrera y en los períodos inmediatamente anteriores a los exámenes (Muñoz, 2003) y siendo menor en los últimos. Idénticos resultados fueron encontrados por Rosenthal y cols. (1987, citado por Muñoz, 2003). Por otro lado, Kohn y Frazer (1986, citado por Misra y McKean, 2000) destacaron como estresores académicos más importantes las notas finales, el excesivo trabajo para casa, los exámenes y el estudiar para los mismos. Estudios posteriores (Celis y cols., 2001; Carlotto y cols., 2005) han coincidido en identificar los mismos principales estresores.

1.5 Sedantes, hipnóticos y ansiolíticos

En el tratamiento del insomnio es importante una adecuada higiene del sueño (mantener un horario de sueño, no hacer ejercicio antes de dormir, apagar la luz, etc.). Sin embargo, el insomnio transitorio (debido al exceso de trabajo, ruido “jet-lag”, etc.) puede no ser necesario el tratamiento farmacológico, o bien si se administra puede ser de sólo dos o tres días. En el insomnio de larga duración, el tratamiento puede alargarse de una a tres semanas (Gómez e Irala, 1996). La elevada utilización de ansiolíticos e hipnóticos, principalmente benzodiazepinas, para el tratamiento de la ansiedad y del insomnio es objeto continuo de revisiones y debates por parte, entre

otros, de las autoridades reguladoras y de los proveedores de asistencia sanitaria en todo el mundo (Rayón y cols., 1997; Magrini y cols., 1996; Carmona y Bicho, 2001). Incluso hay organismos internacionales que han denunciado el aumento del uso de estos fármacos en los países del entorno europeo (Servicio de Información de las Naciones Unidas, 1999). Aunque estas sustancias tienen un papel relevante en el tratamiento de la ansiedad, del insomnio, de las contracturas musculares o de la epilepsia, su empleo indiscriminado no está exento de riesgos debido a sus efectos adversos y a su capacidad para producir tolerancia y dependencia. Las benzodiazepinas de vida intermedia larga pueden producir tolerancia y dependencia. Las benzodiazepinas de vida media e intermedia larga pueden inducir una marcada sedación y falta de coordinación psicomotora, y se han asociado con un incremento de riesgos de producción de fractura de cadera y accidentes de tráfico (Hemmelgarn y cols., 1997; Ray y cols., 1989, Verster y cols., 2002). Por otra parte, las benzodiazepinas de vida media corta, aunque se reconocen como más seguras, se asocian con más reacciones adversas de tipo psiquiátrico y con fenómenos de rebote (Ashton, 1994; Nelson y Chouinard, 1999)

El tratamiento farmacológico del insomnio se realiza gracias a un grupo de agentes que genéricamente son conocidos como hipnóticos y sedantes, que también pueden ser utilizados para el tratamiento de otras patologías.

Un sedante reduce la actividad, modera la excitación y calma, mientras que un hipnótico produce somnolencia y facilita un sueño que de manera óptima debe asemejarse al natural, en otras palabras, se trata de un agente que preserva la arquitectura del sueño; la mayor parte de los fármacos con efecto hipnótico presenta también efecto sedante y viceversa, pero no puede considerarse una regla absoluta.

Las benzodiazepinas han establecido una nueva terapéutica en el tratamiento de la ansiedad, insomnio, agitación, espasticidad y convulsiones. Presentan un amplio margen terapéutico y no producen insuficiencia respiratoria fatal o colapso cardiovascular, siempre que no se asocien a otros depresores del SNC (Reynolds y Martindale, 2009; Flórez y Hurle, 1992; McEvoy, 1996, British National Formulary, 1995; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1995). Las

benzodiazepinas son depresores inespecíficos de la función del SNC y como tales pueden presentar distintos efectos farmacológicos, incluyendo hipnosis, ansiólisis, miorelajación y efecto anticonvulsivo. Estos fármacos son los principales hipnóticos-sedantes, al punto que muchas veces se hace referencia al resto como “agentes no-benzodiazepínicos”, en la actualidad, sin embargo, esta denominación puede generar confusión, pues hay agentes que son químicamente diferentes a las benzodiazepinas, pero interactúan de manera similar con el receptor GABA. Las benzodiazepinas generan sus efectos farmacológicos básicamente por su interacción con receptores de GABA.

El perfil farmacológico que presentan todas las benzodiazepinas es similar. A pesar de todo, los fármacos difieren en su selectividad respecto a los receptores y por ello su uso clínico puede variar. Las últimas investigaciones parecen apuntar que existen varios subtipos de receptores benzodiazepínicos que podrían explicar la diferencia entre efecto sedante (que disminuye la excitación nerviosa), hipnótico (que provoca sueño) y ansiolítico (que disuelve o calma la ansiedad) (Hobbs y cols., 1996; Peppers, 1996; Bailey y cols., 1994). A pesar de los estudios sobre la utilización de las benzodiazepinas, hay muchos estudios científicos que cuestionan el uso de los mismos, debido a sus efectos sobre el sistema nervioso a corto y largo plazo (Sierra y cols., 1993, Bejarano-Romero y cols., 2008).

Cuando se administran por vía oral, las benzodiazepinas presentan una absorción importante, aunque la velocidad de absorción varía entre los diferentes compuestos, dependiendo del grado de liposolubilidad (30-40 minutos).

Además del estudio sobre estos fármacos sintéticos y sus propiedades hipnóticas, en los últimos años han sido de gran importancia los trabajos llevados a cabo sobre la composición de las plantas y los efectos de los fitonutrientes en la salud, especialmente sobre el sueño. Referente al lúpulo y a la cerveza, sus mecanismos hipnóticos, sedantes y ansiolíticos no son muy conocidos, no habiéndose estudiado el papel que juega esta planta en dicha bebida fermentada (Heber, 2004; Mayorga y cols., 2004). Por todo ello, este ensayo tiene gran importancia ya que aporta

resultados obtenidos en humanos que consumieron estos fitonutrientes con propiedades ansiolíticas.

1.6 Neuromoléculas involucradas en el ritmo sueño/vigilia y la ansiedad

1.6.1 El indol Melatonina

En 1960, Lerner y colaboradores aislaron la que se considera la sustancia secretora más importante de la pineal: la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina. Se denominó así debido a su acción blanqueadora cuando se aplicaba en algunas especies nocturnas de vertebrados inferiores. En mamíferos no se han observado cambios diarios en el color, aunque la pineal y la melatonina se han relacionado con los cambios estacionales en la pigmentación cutánea.

La melatonina es un indol de bajo peso molecular presente de manera ubicua en todos los organismos vivos. A pesar de tener una estructura simple (Figura VI), es una molécula pleiotrópica con importantes funciones biológicas desde bacterias hasta mamíferos (Hardeland y cols., 2011). A este respecto, la melatonina ha demostrado ser un potente antioxidante y secuestrador de radicales libres (Paredes y cols., 2007b; Bonnefont-Rousselot y Collin, 2010). Además, este indol está implicado en el control de los ritmos biológicos (Arendt y Skene, 2005), en la regulación de la reproducción (Reiter y cols., 2009a) y en la inmunomodulación (Guerrero y Reiter, 2002).

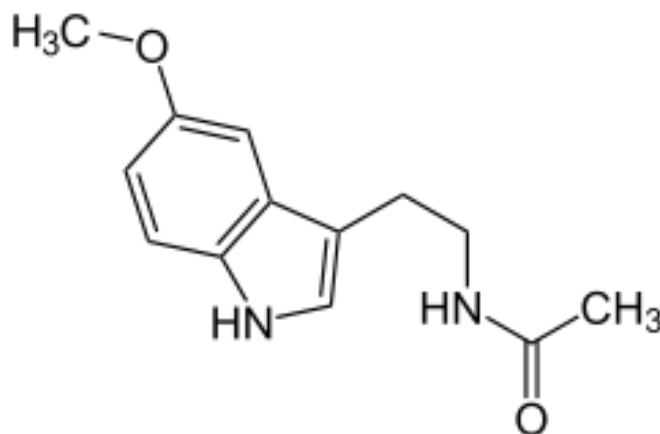


Figura VI. Estructura química de la melatonina.

Metabolismo de la melatonina

A) Biosíntesis:

La biosíntesis de melatonina (Figura VII) comienza con la captación de su precursor, el aminoácido esencial L-triptófano, que es tomado de la sangre por los pinealocitos, a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico (Romero y Axelrod, 1974). A continuación, el triptófano se transforma en 5-hidroxitriptófano mediante una hidroxilación llevada a cabo por la enzima Triptófano-5-hidroxilasa (TPH). Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa para producir serotonina. Las concentraciones de serotonina en la glándula pineal, que son de manera general mucho mayores que en el resto del cerebro, son especialmente elevadas durante el día, y caen marcadamente durante la noche como consecuencia de su conversión a melatonina. Esta conversión nocturna implica un proceso enzimático de dos pasos. Inicialmente, la enzima AANAT, que muestra un incremento de actividad de 30 a 70 veces mayor durante la noche, transforma la serotonina en N-acetilserotonina, aumentando ésta su concentración a valores entre 10 y 30 veces mayores de los que existen durante el día. Después, la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que también incrementa su actividad durante la noche, metila la N-acetilserotonina para producir N-acetil-5-metoxitriptamina, más comúnmente conocida como melatonina.

Alternativamente a la formación de N-acetilserotonina, en la pineal puede producirse la desaminación de la serotonina por la MAO, siendo el producto resultante oxidado a 5-HIAA o reducido a 5-hidroxitriptofol (5-HTL), ambos susceptibles de transformación por la HIOMT para dar lugar a ácido 5-metoxindolacético (5-MIAA) y 5-metoxitriptofol (5-MTL), respectivamente.

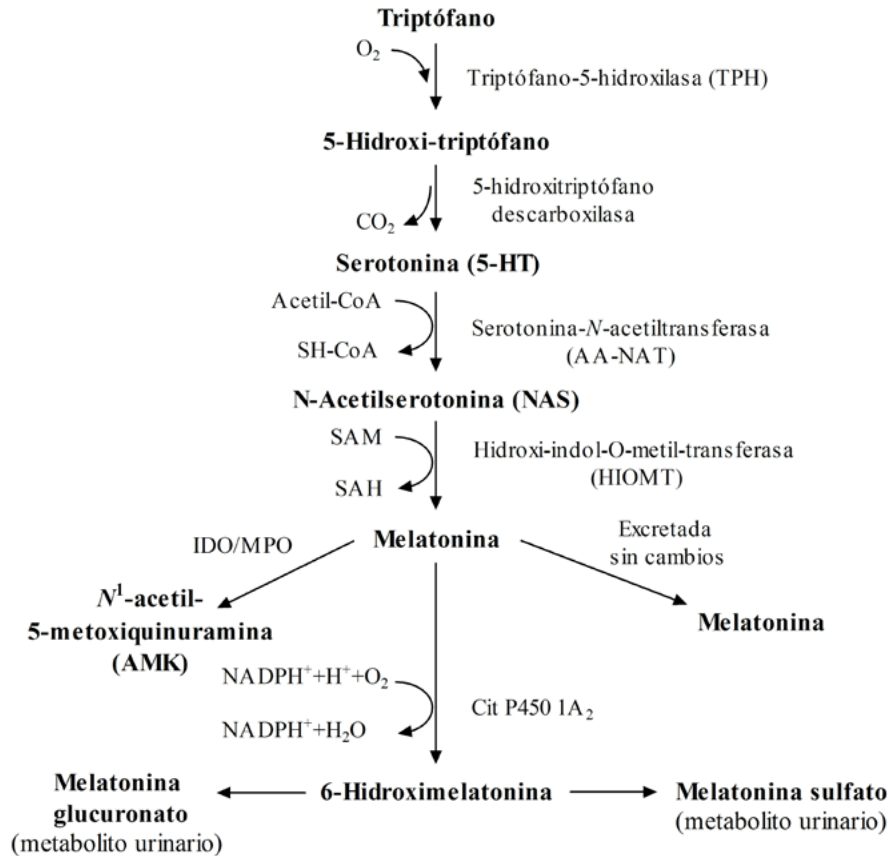


Figura VII. Ruta biosintética de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. Acetil-CoA: acetil coenzima A; SH-CoA: coenzima A; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; MPO: mieloperoxidasa; NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.

La actividad de la AA-NAT determina el ritmo pineal de producción hormonal y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (Hardeland, 2008). La expresión de la enzima se puede regular por una vía nerviosa controlada por el NSQ del hipotálamo, el llamado reloj biológico (Cambras, 2006; Kolker y Turek, 2001). Algunos factores pueden modificar la actividad de la AA-NAT: el estrés y fármacos como la pargilina (inhibidor de la MAO), la isoprenalina (análogo a la noradrenalina), y la desmetilimipramina (bloqueante de la captación de noradrenalina) aumentan la actividad de la AA-NAT, mientras que, por el contrario, los β -bloqueantes y la cicloheximida que inhiben la síntesis proteica, y la ouabaína, que despolariza la membrana, inhiben la AA-NAT (Romero y Axelrod, 1974; Quay, 1981).

B) Distribución:

La melatonina no se almacena en el lugar de síntesis, sino que se secreta directamente tanto al líquido cefalorraquídeo como al sistema cardiovascular (Reiter y cols., 2010a). Además del ritmo diario secretor de esta hormona, aparecen cambios estacionales y circa-anales que la implican como un factor central en la regulación de los procesos rítmicos (Verwey y Amir, 2009). Así, si se cambian las condiciones de luz exterior, se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de la indolamina. Además, este ritmo se pierde en condiciones de iluminación continua mientras que se mantiene, aunque disminuido, si los animales se encuentran en oscuridad. Debido a su alto grado de solubilidad en lípidos, una gran cantidad de melatonina se libera a la circulación a medida que se sintetiza, probablemente a través de un mecanismo de difusión, aunque existen pruebas de la existencia de secreción pulsátil en alguna especie (Pévet y cols., 2006; Masson-Pévet, 2007). La síntesis de este indol no es exclusiva de la glándula pineal, sino que también existe producción de melatonina en retina, hipocampo (Cogburn y cols., 1987; Grace y cols., 1991), cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), glándula de Harder (Vakkuri y cols., 1985), tejido ovárico (Itoh y cols., 1999), plaquetas (Launay y cols., 1982), células mononucleares periféricas (Finocchiaro y cols., 1995), las células de la médula ósea (Conti y cols., 2000), el aparato digestivo (Tan y cols., 1999a), el sistema inmune (Barriga y cols., 2005) y el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992). Sin embargo, a diferencia de la melatonina sintetizada en la glándula pineal, la hormona melatonina producida por estos tejidos no pasa a la sangre en cantidades significativas, sino que funciona localmente como una señal autocrina o paracrina (Pandi-Perumal y cols., 2006), siendo los niveles tisulares de melatonina cientos de órdenes de magnitud mayores que los sanguíneos (Reiter y Tan, 2003).

C) Eliminación:

La vida media de la melatonina circulante varía entre 20-40 minutos (Boutin y cols., 2005), lo que indica que es una hormona de acción rápida. Transcurrido este tiempo, la mayor parte de la melatonina circulante es inactivada mediante su conversión hepática en 6-hidroxi melatonina y es excretada en la orina en forma de

sulfatos (75%) o glucurónidos (5%) (Alonso, 1999). La melatonina también puede seguir otras vías catabólicas como la desacetilación y desaminación para convertirse en 5-MIAA y 5-MTL (Galzin y cols., 1988; Grace y cols., 1991). En la glándula pineal y cerebro también es posible su transformación en quinureninas, en presencia de IDO (Hirata y cols., 1974), o su transformación de forma no enzimática mediante la reacción con el anión hidroxilo (OH⁻), el anión superóxido (O₂⁻) o con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Tan y cols., 1998; Tan y cols., 2000a). Entre las quinureninas derivadas destacan la N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinurenamina (AFMK) y la N1-acetil-5-metoxiquinurenamina (AMK), moléculas estables que se eliminan por la orina. Estas quinureninas, al igual que la melatonina, presentan importantes efectos como secuestradoras de radicales libres (Reiter y cols., 2008a).

La magnitud y duración del incremento nocturno de la síntesis de melatonina va a depender de la longitud de la fase oscura del ciclo fotoperiódico. Por tanto actúa como “reloj” y “calendario” para la regulación de otras actividades biológicas, independientemente de que la actividad del animal sea diurna o nocturna. Por dicha razón, la melatonina es considerada como mensaje de la oscuridad y no del descanso o periodo de sueño (Illnerova y cols., 2000).

Propiedades antioxidantes del indol melatonina.

En 1991, se realizó la primera observación sobre las propiedades antioxidantes de la melatonina (lanas y cols., 1991), hecho confirmado en 1993, cuando se demostró que la melatonina neutraliza OH⁻ (Tan y cols., 1993a). Desde entonces, numerosos trabajos han demostrado su actividad como antioxidante (Shifow y cols., 2000; Sewerynek y cols., 1996) endógeno al interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Reiter y cols., 2009b; Wakatsuki y cols., 2001), tales como H₂O₂ (Tan y cols., 2000b), NO (óxido nítrico) (Crespo y cols., 1999), ONOO⁻ (anión peroxinitrito) (Zhang y cols., 1999), HCl (ácido clorhídrico) (Dellegar y cols., 1999), O₂⁻ (Cagnoli y cols., 1995) y radical peróxido (ROO[·]) (Pieri y cols., 1994). Además, la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción

indirecta para la reducción del estrés oxidativo (Kotler y cols., 1998; Mayo y cols., 2002; Reiter y cols., 2010c). En este sentido, actúa estimulando enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), y glutatión reductasa (GRd), regulando así el balance glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) (Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1998; Terrón y cols., 2005). Inhibe también enzimas que generan radicales libres, como la 5-aminolevulinato sintasa (Antolín y cols., 1996) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Escames y cols., 2003). Por otro lado, la melatonina potencia el efecto de otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Guerrero y cols., 2007). De este modo, su eficacia es mucho mayor que si actuara de forma independiente, como ocurre con la mayoría de antioxidantes. De hecho, se ha demostrado que la melatonina es una molécula con efectos antioxidantes mucho más potentes que los antioxidantes clásicos, tanto in vivo como in vitro (López-Burillo y cols., 2003; Túnez y cols., 2007; Yamamoto y Mohanan, 2003). La naturaleza tanto lipofílica (Reiter, 1991b) como hidrofílica (Shida y cols., 1994) de la melatonina le confiere la capacidad de atravesar cualquier barrera morfofisiológica, enriqueciendo los compartimentos subcelulares. Este hecho, junto a la existencia de mecanismos activos de captura de la molécula, hacen que la melatonina pueda realizar sus funciones antioxidantes en múltiples compartimentos, como el núcleo (Tan y cols., 1993b), el citosol (Abe y cols., 1994) y las membranas (Giusti y cols., 1995; Melchiorri y cols., 1995), tomando especial interés en la mitocondria donde se han detectado concentraciones de melatonina muy por encima de los niveles plasmáticos durante el pico nocturno (Acuña-Castroviejo y cols., 2003; León y cols., 2004).

Melatonina en plantas

Hace más de dos décadas que Poeggeler y Hardeland (1994) descubrieron la presencia de melatonina en el alga fotosintética *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*). Este hecho puso de manifiesto la existencia de esta molécula también en el reino vegetal, hecho por el que se empezó a enfocar la investigación en torno a este campo. El número de artículos publicados en relación a la melatonina en plantas ha aumentado mucho en los últimos años (Paredes y cols., 2009d; Iriti y cols., 2010). Así, la melatonina ha sido identificada en las raíces, tallos, hojas, flores y

semillas de distintas plantas (Paredes y cols., 2009d; Iriti y cols., 2010; Manchester y cols., 2000). Sin embargo, a lo largo de los años se ha demostrado que la enorme variedad de carbohidratos, lípidos, pigmentos, y en general metabolitos primarios y secundarios presentes en las plantas, poseen en muchas ocasiones propiedades farmacológicas y antioxidantes que pueden inducir falsos positivos, falsos negativos e interferir con determinaciones realizadas mediante RIA. Incluso se pueden confundir con la melatonina en determinaciones llevadas a cabo con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) debido a la capacidad de estas moléculas de mimetizarse con la melatonina (Caniato y cols., 2003; Kolár y Machácková, 2005).

Una de las funciones principales de la melatonina en plantas podría ser la protección contra factores ambientales adversos y procesos endógenos que generan radicales libres. Esta hipótesis se apoya en el descubrimiento de que el estrés por frío eleva significativamente los niveles de producción de melatonina en plantas (Tan y cols., 1999b; Parlakpinar y cols., 2003). Además, la identificación de altos niveles de melatonina en una planta altamente resistente a la contaminación, el Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) (Tan y cols., 2007a), ha revelado el posible rol protector de este indol en el reino vegetal. Esta especie tolera ambientes muy contaminados y, por tanto, se utiliza en fitorremediación (Agunbiade y cols., 2009). La alta producción de melatonina en esta planta se cree que desempeña un papel fundamental contra las agresiones ambientales que generan las ERO. Numerosos estudios han revelado el efecto que ejerce la melatonina ante factores ambientales adversos y diferentes agentes estresantes cuando se aplica exógenamente a plantas. Estos factores incluyen ambientes extremadamente fríos o calientes (Posmyk y cols., 2009), la radiación ultravioleta (Zhang y cols., 2011), la exposición a metales pesados (Tan y cols., 2007b), el suelo salado y la toxicidad por peróxido de hidrógeno (Arnao y Hernández-Ruiz, 2009). En este sentido, los efectos protectores del indol en plantas, al igual que en vertebrados, se atribuyen principalmente a su acción como secuestrador de radicales libres y como potente antioxidante (Tan y cols., 2012).

Recientemente se ha demostrado que es posible diseñar plantas modificadas genéticamente que generen altas cantidades de melatonina (Okazaki y cols., 2009; Kang y cols., 2010). Estos estudios han sugerido que la enzima AA-NAT, al igual que en

animales, es esencial para la producción de melatonina en plantas, hecho que está teniendo una enorme repercusión en los campos de la nutrición y la fitorremediación.

Son muchas las plantas comestibles, frutas y alimentos en las que se han encontrado cantidades detectables de melatonina. Además, esta molécula también se ha encontrado en plantas medicinales (Reiter y Tan, 2002; Reiter y cols., 2007; Reiter y cols., 2010b), las cuales se han usado tradicionalmente para retrasar el envejecimiento y luchar contra los radicales libres (Chen y cols., 2003).

1.6.2 El Cortisol

El cortisol es el principal glucocorticoide secretado por la corteza suprarrenal humana y el esteroide más abundante en la sangre periférica, si bien también se encuentran cantidades menores de corticosterona. En el hombre, estudios cinéticos de la conversión del colesterol libre del plasma en cortisol, han demostrado que, en esencia, todo el cortisol secretado deriva del colesterol circulante en condiciones basales y como resultado de la estimulación aguda con adrenocorticotropina (ACTH)

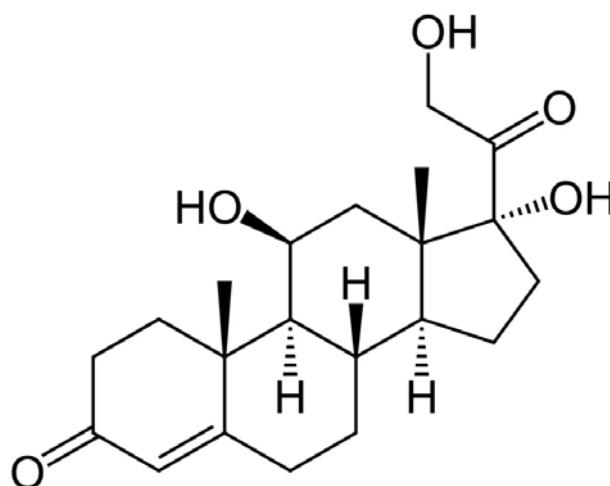


Figura VIII: Esquema del glucocorticoide cortisol.

El colesterol (Figura VIII) suprarrenal se transforma en el esteroide C-21 denominado pregnenolona por una serie de reacciones en las que intervienen oxidasas de función mixta. Luego, la pregnenolona se convierte en 17 α -hidroxipregnenolona y en progesterona. El cortisol se sintetiza a partir de estos dos precursores mediante una

serie de reacciones de oxidación. No se ha resuelto el problema de la importancia cuantitativa de la ruta que incluye la progesterona y de la que sigue la vía de la 17 α -hidroxipregnenolona en la formación del cortisol. Las cortezas suprarrenales secretan dos hormonas esenciales: el cortisol y la aldosterona. (Stephen y cols., 1998) El cortisol, el glucocorticoide predominante, estimula la glucogenólisis, la proteólisis y la lipólisis, tiene efectos cardiacos inotrópicos e induce la expresión genética de varias proteínas reguladoras y secretoras (Leigh Gibson y cols., 1999). La aldosterona promueve la retención urinaria de sodio e incrementa la excreción de potasio y de hidrógeno. Los síndromes clínicos de disfunción corticosuprarrenal son más comúnmente el resultado de la secreción alterada de una o de ambas hormonas (Botey, 2006).

Regulación en la secreción de cortisol

La secreción de cortisol está determinada por el eje hipotálamo pituitaria hipófisis bajo la estimulación del factor de liberación de corticotropina (CRF) procedente del hipotálamo (Donaldson, 1981). La hormona ACTH está relacionada con la glándula pituitaria que es el principal secretagogo del cortisol. El control de la secreción de la ACTH ha sido revisado por Fryer y Lederys, 1986 y Lederis y cols., 1993, y basta con decir que algunos factores, incluidas hormonas, estrés (Sumpter y cols., 1986; Balm y cols., 1994) y el control negativo del cortisol al nivel del hipotálamo y pituitaria podría modular la secreción de ACTH y en consecuencia la producción de cortisol.

Los ritmos secretorios de cortisol son altos al comienzo de la mañana y bajos al final de la tarde noche. Este efecto resulta de una alteración cíclica durante 24 horas de las señales procedentes del hipotálamo que provocan la secreción de cortisol. Cuando una persona cambia su ritmo diario de sueño, el ciclo del cortisol cambia del mismo modo. Las mediciones de las concentraciones sanguíneas de cortisol sólo tienen valor cuando se expresan señalando el momento del ciclo en el cuál se efectuó la medición (Gyuton y Hall., 2006). Los impulsos de secreción guardan correlación generalmente con la concentración plasmática de ACTH. No obstante, algunos

individuos muestran escasa correlación entre la ACTH (Gamperl y cols., 1994). A continuación en la Figura IX se detalla la biosíntesis del colesterol.

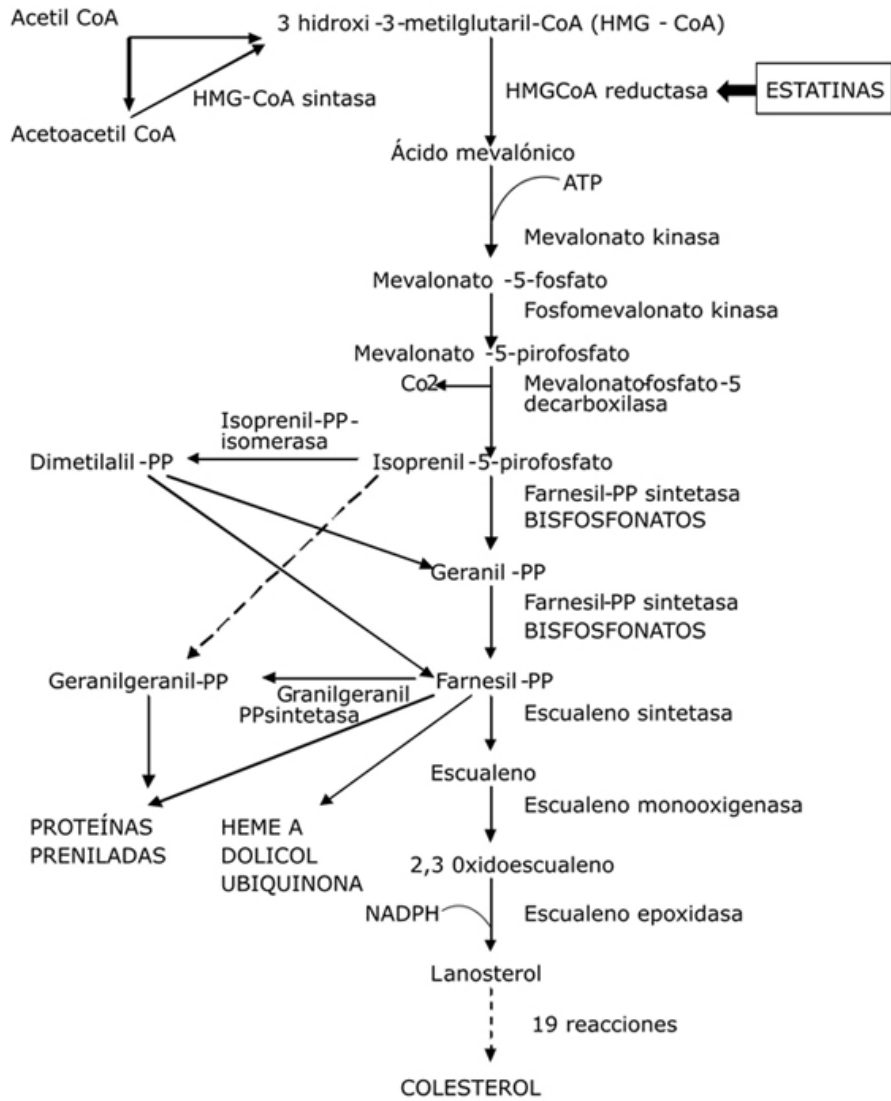


Figura IX: Biosíntesis del colesterol. ATP: Adenosin trifosfato; NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.

Metabolismo del cortisol

El cortisol, como otras hormonas esteroideas, ejerce sus efectos mediante su interacción inicial con los receptores intracelulares de las células efectoras. El cortisol es liposoluble y se difunde con facilidad a través de la membrana celular. Una vez en el

interior de la célula, se une a una proteína receptora del citoplasma y luego, el complejo hormona-receptor interactúa con secuencias reguladoras específicas del ADN denominadas elementos respuesta a los glucocorticoides, que inducen o reprimen la transcripción génica. También son necesarios los factores de transcripción, para la interacción adecuada entre el complejo hormona-receptor y los elementos de respuesta de los glucocorticoides. Debido a esta regulación, los efectos del cortisol no son inmediatos, sino que tardan de 45 a 60 minutos en manifestarse, tiempo necesario para la síntesis de esas proteínas, e incluso varias horas o días (Gyuton y Hall., 2006).

A diferencia de la secreción de la aldosterona en la zona glomerular, controlada sobre todo por el potasio y la angiotensina, casi ningún estímulo ejerce efectos reguladores directos sobre las células suprarrenales secretoras de cortisol. En su lugar, la secreción de cortisol está sometida de forma casi exclusiva al control de la ACTH (Gyuton y Hall., 2006).

Efectos del cortisol

1.- Sobre la inflamación.

a) Estabiliza membranas liposómicas. Aumenta la resistencia a la rotura y por tanto, en las células dañadas, se produce una disminución en la liberación de enzimas proteolíticas que inducen la inflamación y se encuentran en los lisosomas.

b) Reduce la permeabilidad de los capilares, lo que impide la salida de plasma hacia los tejidos.

c) Disminuye la emigración de los leucocitos a la zona inflamada y la fagocitosis de las células dañadas. Estas acciones se deben al descenso, inducido por esta hormona, de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos.

d) Inhibe el sistema inmunitario y reduce mucho la multiplicación de los linfocitos, sobre todo los linfocitos T.

e) Disminuye la fiebre, sobre todo porque reduce la liberación de la interleucina-1 por los leucocitos, uno de los principales estimuladores del sistema termorregulador hipotalámico.

2.- Bloquea la respuesta inflamatoria de las reacciones alérgicas. No influye en la reacción alérgica básica entre el antígeno y el anticuerpo, por lo que pueden observarse algunos efectos secundarios en la reacción alérgica.

3.- Reduce el número de eosinófilos y de linfocitos de la sangre. La detección de esta linfocitopenia o eosinopenia constituye un criterio de diagnóstico importante de la hiperproducción de cortisol por la glándula suprarrenal.

1.6.3 Neurotransmisor Serotonina

En el año 1936, Vialli y Erspamer encontraron una molécula en las células enterocromafines de la mucosa digestiva a la que denominaron *enteramina* que tenía la propiedad de estimular la contracción de la musculatura lisa del sistema gastrointestinal. Unos años más tarde, en 1948, Rapport y colaboradores, aislaron del suero sanguíneo esta misma molécula vasoconstrictora a la que denominaron serotonina, que identificaron como 5-hidroxitriptamina y que era la misma molécula que la enteramina (Rapport y cols., 1948).

En la actualidad se sabe que la serotonina es una sustancia perteneciente a las aminas biógenas, que actúa como neurotransmisor y como neuromodulador, y que juega un papel importante en el humor, ansiedad y sueño distribuyéndose por todo el organismo en el que ejerce múltiples funciones. Está presente en la mayoría de las especies animales y vegetales, localizándose en el caso de los mamíferos, en un 95% en el tracto gastrointestinal, principalmente en células enterocromafines (86%) y en menor proporción (9%) en las neuronas del sistema nervioso entérico, y el resto en las plaquetas y neuronas triptaminérgicas del SNC y del sistema nervioso entérico (Gershon y cols., 1965; Ahlman y cols., 1981; Gronstad y cols., 1985; Wade y cols., 1994; Gershon, 2004).

La mayor parte de las neuronas que producen serotonina se localizan en una zona restringida del encéfalo, entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, donde se reagrupan en núcleos bien conocidos: los núcleos del rafe. Dejan también una pequeña población de estas neuronas a nivel del núcleo dorsomedial hipotalámico. A pesar de la importancia y la diversidad de los mecanismos serotoninérgicos en el SNC, el cerebro contiene muy poca serotonina en términos relativos, ya que, como se mencionó anteriormente, el 95% de la serotonina reside en el tracto digestivo y otra pequeña fracción en las plaquetas, que la recaptan de la circulación sanguínea para liberarla cuando son activadas. La serotonina además, es sintetizada en la retina, en la glándula pineal, en las células enterocromafines del intestino, en los cuerpos neuroepiteliales de los pulmones y en las células parafoliculares del tiroides (Gaspar y cols., 2003).

Biosíntesis y Metabolismo del neurotransmisor Serotonina

La hidroxilación del triptófano en posición 5 del anillo pirrólico para formar 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (TpH-1), constituye la primera etapa de la biosíntesis de la serotonina, en la que se produce la regulación de la producción de la amina, ya que la enzima TpH-1 actúa como factor limitante en la síntesis de la serotonina. El 5- hidroxitriptófano es descarboxilado por la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa para dar lugar a serotonina (Touitou y cols., 1996), que una vez sintetizada pasa a la sangre donde es captada por las plaquetas (Figura X).

En lo que se refiere al metabolismo, la serotonina es objeto de dos reacciones de conjugación para facilitar su excreción. La principal vía catabólica es la desaminación oxidativa por la MAO (Molinoff, 1971; Gershon y cols., 1990; Touitou y cols., 1996) dando origen a su principal metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxi-indolacetaldehído.

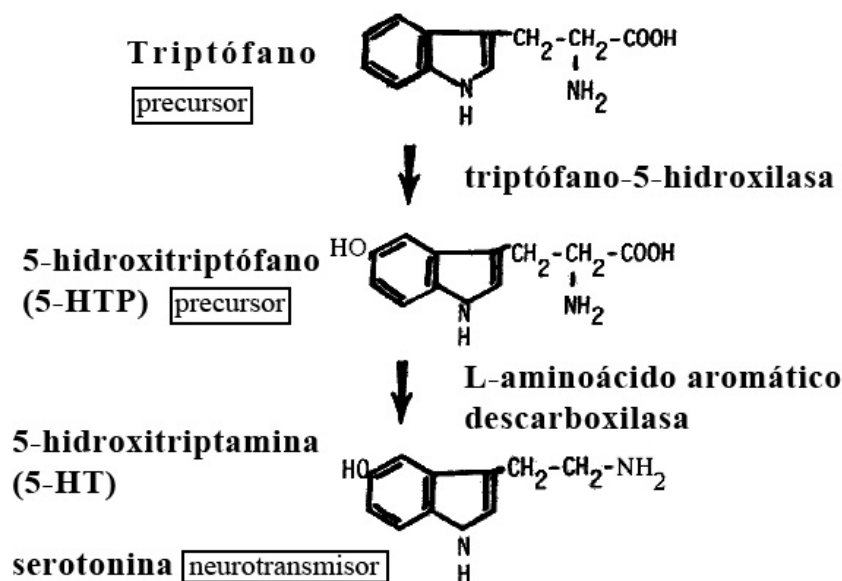


Figura X: biosíntesis de la serotonina

Este producto, a continuación es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD^+ , obteniéndose ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) como producto final. En el aparato digestivo también es degradada la serotonina por transferasas y otras enzimas (Airaskinen y cols., 1965). Todas estas enzimas son moléculas intracelulares, lo cual exige que la serotonina sea previamente captada por las células para proceder a su inactivación (Fuller y Wong, 1990; Iversen, 2000).

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, 1998). Aproximadamente el 2% del triptófano presente en la dieta se utiliza para la síntesis de serotonina. Este proceso se encuentra aumentado en personas con tumor carcinoide (Peart y cols., 1961; Camilleri y Von der Ohe, 1994). Por tanto, la concentración de serotonina en el cerebro es directamente proporcional a la concentración de triptófano en el plasma y cerebro, hecho que se encuentra influenciado por la ingesta dietética de triptófano (Aldegunde, 1998; Winberg y cols., 2001; Mateos y cols., 2009; Paredes y cols., 2009b).

Recientes investigaciones neuroquímicas se han centrado en estudiar cómo afecta la alimentación a las concentraciones de triptófano en el cerebro y a la síntesis y disponibilidad de serotonina (Zhang y cols., 2006; Bechtholt y cols., 2007), mientras que investigaciones farmacológicas se han centrado en el control del apetito, por

medio de medicamentos serotoninérgicos (Halford y cols., 2007; Lam y cols., 2008; Somerville y cols., 2007).

Por otro lado, se ha observado que la administración de agonistas serotoninérgicos no selectivos indirectos en ratas de laboratorio, cuya función es liberar serotonina, disminuye el apetito. Asimismo, 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). Igualmente, podría esperarse que la activación de receptores somatodendríticos 5-HT_{1A} inhiba el disparo neural serotoninérgico y la consiguiente liberación de serotonina (Gómez y Llorca, 2000). Además, los efectos hipofágicos de los agonistas de los receptores 5-HT₁ son más pronunciados en ratas hembras, hecho que podría ser de gran relevancia para los trastornos de la alimentación en humanos, tales como anorexia y bulimia nerviosas, que tienen una importante tasa de incidencia en mujeres jóvenes (Schreiber y cols., 2000). De hecho, la hiperserotoninergia produce anorexia y la hiposerotoninergia propicia una notable ganancia de peso (Boullosa y cols., 1992).

Por tanto, podemos decir que la serotonina es el principal mediador activador del núcleo hipotalámico ventromedial, también conocido como “centro de la saciedad” y, por tanto, que regula la ingesta y la saciedad. Se trata de un efecto altamente específico para los hidratos de carbono, necesitando de cofactores centrales y periféricos para actuar sobre proteínas y lípidos (Boullosa y cols., 1992).

Funciones de la Serotonina

En función de su lugar de síntesis, la serotonina afecta a procesos fisiológicos tan diferentes como la hemostasia primaria, el movimiento y la ansiedad intestinal (Gingrich y Hen, 2001; Gershon y Tack, 2007; Berger y cols., 2009). Esta gran variedad de funciones en las que interviene el sistema serotoninérgico se refleja en la complejidad farmacológica de los receptores de serotonina. Así, atendiendo a sus características morfológicas, estructurales y transduccionales, existen hasta el momento siete familias de receptores (Hoyer y cols., 1994), codificadas por quince

genes diferentes, que se caracterizan por estar acopladas a proteínas G, excepto la clase 5-HT₃, que está ligada a un canal iónico. Las variaciones genéticas en los alelos que codifican los receptores de serotonina actualmente son conocidas por tener un impacto significativo sobre la probabilidad de generar ciertos problemas y desórdenes fisiológicos (Baumel, 1999; Cubero y cols., 2011).

El sistema serotoninérgico tiene una amplísima distribución en el SNC, influyendo en casi todas sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas. La mayoría de las vías serotoninérgicas se originan a partir de las neuronas del rafe o de la región medial del puente y la corteza cerebral. De esta forma se observa su regulación en el sistema cardiovascular (Nebigil y cols., 2003; Kaumann y Levy, 2006), diferentes funciones neuroendocrinas (Boullosa y cols., 1992), la respiración y el sistema gastrointestinal (Kato y cols., 1999). Más concretamente, en lo que se refiere al papel de la serotonina en el SNC, se ha demostrado que este neurotransmisor está involucrado en diferentes funciones, entre las que se encuentran el sueño, apetito, temperatura, ansiedad, actividad motora, ritmos biológicos, aprendizaje y memoria. Por todo ello, se puede afirmar que la serotonina es una sustancia neuroactiva que circula como vehículo de información entre las células del sistema nervioso del organismo y modula y participa en muchos procesos fisiológicos.

Los niveles de serotonina cerebral también influyen en el comportamiento sexual. De hecho, se podría decir que esta amina es la “hormona del placer”, ya que después de la eyaculación aumenta considerablemente la cantidad de serotonina en el cerebro, provocando un estado de placer y tranquilidad (Olivier y cols., 1998). Después de este goce se produce un proceso de retroalimentación para reabsorber la serotonina. Este mecanismo estimula la liberación de hormonas como la somatotropina y la prolactina e inhibe la secreción de las hormonas luteinizante y estimuladora del folículo, que son las encargadas de estimular la síntesis de AMPc, que a su vez provocan la biosíntesis de esteroides sexuales (Shen y Hsu, 1995). Este mecanismo de retroalimentación no sería posible si no se produjese la reabsorción de serotonina a nivel de la hipófisis (Gitlin, 1994). Asimismo, está implicado en el mantenimiento de los ritmos circadianos, aumentando durante el día la captación de

triptófano para formar serotonina en la glándula pineal entre otras regiones (Gutiérrez y cols., 2003).

La serotonina también influye en el comportamiento agresivo. De hecho, existe relación entre una función serotoninérgica disminuida y un aumento de testosterona en sujetos agresivos (Young y Leyton, 2002). Este neurotransmisor juega un papel importante en la regeneración hepática (Jeyabalan y Geller, 2006; Gershon y Tack, 2007) en el aprendizaje y la memoria. En la mayoría de las áreas del SNC, la serotonina tiene una acción inhibitoria fuerte mediada por los receptores 5-HT_{1A} y está asociada a una hiperpolarización de la membrana causada por un aumento en la conductancia del potasio. La alteración de la actividad serotoninérgica en el SNC parece estar involucrada en la aparición de diversas patologías neuropsiquiátricas, tales como desórdenes afectivos, conductas obsesivo-compulsivas, pánico y afectación estacional (De Montigny y Blier, 1985; Pecknold y cols., 1994; Yura y cols., 1996; Frazer, 1997), estando además implicada en la etiología de otras enfermedades como, ansiedad, estrés, depresión o esquizofrenia (Sandyk, 1992; Purselle y Nemeroff, 2003) y también en alteraciones del tracto gastrointestinal, como el síndrome de intestino irritable y la colitis ulcerosa (Coates y cols., 2004; Gershon, 2004). Por este motivo, muchas sustancias que modulan el sistema serotoninérgico son la base de los tratamientos farmacológicos para estas enfermedades. Además, el transportador de serotonina (SERT), que es la proteína de membrana encargada de introducir dentro de la célula la serotonina, y que en consecuencia reduce la disponibilidad de serotonina en el medio extracelular, se ha convertido en la principal diana farmacológica para el tratamiento de las patologías psiquiátricas en las que el sistema serotoninérgico se encuentra alterado. Este es el caso de diversos tipos de antidepresivos, como los tricíclicos, que impiden la recaptación de noradrenalina y serotonina, y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) (Frazer, 1997; Cubero y cols., 2011). Estos compuestos inhiben la recaptación de serotonina inmediatamente. Sin embargo el efecto terapéutico se alcanza después de un tratamiento largo y repetido. Asimismo, recientes estudios han puesto de manifiesto la implicación que podría tener el neurotransmisor serotonina sobre diferentes patologías como síndrome de Down, autismo, alzhéimer o epilepsia (Sodhi y Sanders-Bush, 2004).

1.7 Lúpulo, cerveza, sueño y ansiedad

Tal y como se ha expuesto en los apartados anteriores, existen numerosos y conocidos productos farmacéuticos para combatir la ansiedad y el insomnio. Muchos de estos productos están basados en la fitoterapia conteniendo extracto seco de lúpulo (*Humulus lupulus*) junto a tila (*Tilia cordata*), melisa (*Melissa officinalis*), valeriana (*Valeriana officinalis*) o camomila (*Matricaria recutita*) (Ros, 2009; Salter y Brownie, 2010).

El lúpulo ha sido utilizado tradicionalmente como planta tranquilizante. Su actividad sedante radica principalmente en sus ácidos amargos, en particular su componente alfa ácido: 2-Metil-3-buten-2-ol (Hansel y cols., 1980; Zanolli y Zavatti 2008; Weeks, 2009). El mecanismo de acción de la resina del lúpulo consiste en modular los receptores del neurotransmisor GABA inhibitor del SNC (Aoshima y cols., 2006; Zanolli y cols., 2007; Schellenberg y cols., 2004).

Debemos además reseñar la existencia de otros componentes aromáticos que se encuentran en el lúpulo como son el myrcenol (Aoshima y cols., 2006) y xantumol, ambos con efecto sedante. Señalar el trabajo realizado en 2004 por Schellenberg y cols., donde se estudia el efecto asociado del lúpulo y la valeriana sobre el mecanismo central de la adenosina, nucleótido clave en el sueño. Así, se observa un incremento de las ondas alfa en un EEG, generando a través de los receptores de adenosina inductores del sueño (Schellenberg y cols., 2004). Aunque en concentraciones mínimas, la cerveza contiene melatonina, hormona que reforzaría el efecto sedante de la cerveza (Maldonado y cols., 2009; Kotronoulas y cols., 2010). Finalmente apuntar la presencia del aminoácido esencial lisina con acción antagónica sobre los receptores serotoninérgicos 5HT4 del tracto gastrointestinal, los cuales quedan bloqueados disminuyendo los síntomas intestinales asociados a situaciones de estrés y cuadro de ansiedad (Smirga y Torii, 2003; Smirga y cols., 2004; Ghosh y cols., 2010).

En resumen, existen numerosos componentes en la cerveza, principalmente el lúpulo, que pueden albergar la capacidad de encarrilar el ritmo del sueño, además de favorecer la inducción del mismo (Franco y cols., 2012a; Franco y cols., 2012b), hecho que llevaría también a disminuir el estado de ansiedad.

2. Justificación y Objetivos



En cada instante de nuestra vida, nuestro organismo reacciona de la forma más adecuada para estar en armonía con nuestro entorno cambiante de luz (día)/Oscuridad (noche) y conseguir nuestra supervivencia. Consecuencia de ello es la aparición de variaciones rítmicas en las funciones fisiológicas, que se anticipan a los cambios predecibles. Es decir, de noche en oscuridad permanecemos dormidos, y de día con la luz estamos despiertos. Sin embargo, situaciones de estrés o trabajos en turnos rotatorios provocan una cronodisrupción en la mayoría de los ritmos circadianos. Esta desincronización se traduce en desajustes en la regulación de importantes funciones fisiológicas como es el ciclo de sueño/vigilia o el estado de ánimo (Poeggeler, 2005; Hardeland, 2012).

La cerveza es una bebida fermentada típica y tradicional de nuestra dieta mediterránea y que está relacionada con esparcimiento y ocio. Sin embargo, en estos últimos 20 años se ha demostrado, mediante numerosas investigaciones biomédicas, que su ingesta moderada es beneficiosa para la salud, ya que contiene numerosas vitaminas hidrosolubles, fibra y minerales pero con baja concentración de sodio. Esta bebida de baja graduación alcohólica posee un aporte calórico moderado (45 kcal/100 ml), de hecho, estudios realizados por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas han constatado que, tras la ingesta de forma moderada (una cerveza en las mujeres y dos en el caso de los varones), no se produjo ninguna alteración en el peso (Romero y cols., 2007).

Los trabajos realizados por Schellenberg y cols. (2004) ponen de manifiesto la influencia de la cerveza en el sueño, ya que al analizar el efecto del lúpulo y la valeriana en el mecanismo central de la adenosina, se observó un incremento de las ondas alfa en EEG, generado por los receptores de adenosina inductores del sueño. Además, debemos mencionar que hay otro componente aromático en la cerveza, el mircenol (Aoshima y cols., 2006), que es un modulador positivo de los receptores GABA y por lo tanto posee un efecto sedante así como capacidad para paliar las alteraciones del sueño (Zanoli y Zavatti, 2008). Finalmente, señalar que al contener melatonina la cerveza, se podría justificar la acción inductora del sueño por esta indolamina (Maldonado y cols., 2009; Kotronoulas y cols., 2010). En resumen, hay

diferentes componentes en la cerveza que pueden albergar la capacidad de favorecer la inducción y encarrilar el ritmo del sueño.

Los fármacos hipnóticos ocupan el cuarto lugar de los más vendidos con receta médica, ya que la falta de sueño en la población actual es un grave problema con el que se enfrenta la Sanidad. De hecho, las personas que descansan mal tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el sistema inmune y la acumulación de radicales libres. Debido a que la prevención de enfermedades crónicas constituye una mejor estrategia que su tratamiento, reducir el riesgo de este tipo de enfermedades se ha convertido en una materia de gran interés para profesionales de la salud, científicos y para la industria alimentaria (Liu, 2003). Por esta razón muchos alimentos funcionales son diseñados actualmente con el objetivo de proporcionar una ingesta elevada de biomoléculas activas y reducir el riesgo de enfermedades asociadas al envejecimiento y estrés oxidativo. El término alimento funcional se refiere a un alimento o ingrediente capaz de mejorar la salud y/o reducir el riesgo de enfermedad (Rafter, 2002). Además, se trata de alimentos a consumir dentro de una dieta normal para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales (Roberfroid, 2002).

En vista de los antecedentes comentados, y dado el carácter sedante y/o tranquilizante del lúpulo de la cerveza, evitando el efecto que el etanol pudiera ejercer sobre la población a estudio, y dado los problemas de sueño que nos encontramos en la sociedad, el Objetivo General de la presente Tesis Doctoral ha sido analizar los beneficios de la cerveza sin alcohol en el ritmo actividad/reposo de animales diurnos (*Coturnix coturnix*) y en el ritmo sueño/vigilia y estado de ánimo en dos grupos de personas sometidas a estrés: Personal Sanitario del Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES) y Estudiantes Universitarios (UEx) en periodo de exámenes oficiales.

Este Objetivo General ha sido desglosado a su vez en los siguientes **Objetivos Específicos:**

1. Estudio con animales de hábitos diurnos (*Coturnix coturnix*), tras la ingesta de cápsulas con extracto de lúpulo (*Humulus lupulus*) con una concentración igual a la contenida en una cerveza sin alcohol, sobre el patrón actividad/reposo.

2. Evaluar cómo actúa la cerveza sin alcohol, ingerida en la cena, sobre el ritmo sueño/vigilia y estado de ánimo en dos grupos de personas sometidas a estrés:
 - 2.1. En el Personal Sanitario del Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES), en el que se evaluaron los siguientes parámetros:
 - 2.1.1. Parámetros del sueño nocturno mediante activimetría
 - 2.1.2. Análisis nutricional y hábitos alimentarios
 - 2.1.3. Capacidad Antioxidante en orina

 - 2.2. En Estudiantes Universitarios (UEx) sometidos al estrés de exámenes finales en los que se analizaron:
 - 2.2.1. Parámetros del sueño nocturno mediante Activimetría y ansiedad
 - 2.2.2. Calidad subjetiva del sueño
 - 2.2.3. Neuromoléculas implicadas en la ansiedad: Cortisol, Serotonina y Melatonina

2. Justification and Objectives



In every moment of our life, our body reacts in the best way to be in harmony with the changing environment of light (daytime)/darkness (nighttime) and keep working. As a consequence of this, the existence of rhythm variations in the physiological functions can foretell the predictable changes. Hence we fall asleep during the night in darkness and during the day, when there is light, we are awake. However, there are some stress situations or jobs with rotating shifts that might produce a chronodisruption in most of circadian rhythms. This desynchronization produces mismatches on the regulation of important physiological functions like sleep/awake cycle or mood (Poeggeler, 2005; Hardeland, 2012).

Beer is a typical and traditional fermented beverage in the Mediterranean diet and it is associated with recreation and leisure. However, during the past 20 years and throughout many biomedical investigations, numerous benefits have been demonstrated after moderate consumption of this beverage because it contains water-soluble vitamins, fiber and minerals, but low concentrations of sodium. This low-proof alcoholic beverage has a moderate caloric contribution (45 kcal/100 mL). According to a study conducted by the Spanish National Research Council, after moderate consumption of beer (women: 1 beer/day; men: 2 beers/day), body weight suffered no alteration at all (Romero y cols., 2007).

A study reported by Schellenberg et al. (2004) shows the influence of beer in sleep function through the effect of hops and valerian on the adenosine central mechanism. It has been observed an increase in alpha waves in EEG generated by the adenosine receptors involved in sleep function. Besides this, it might be mentioned that there is another aromatic component in beer, myrcenol (Aoshima et al., 2006), which is a positive modulator of GABA receptors and therefore it has a sedative effect as well as a capacity to palliate sleep disorders (Zanoli and Zavatti, 2008). Finally, due to the melatonin content in beer, the sleep-inducing effect could be justified because of this indoleamine (Maldonado et al., 2009 Kotronoulas et al, 2010). In conclusion, there are different components in beer that can be beneficial on human body clock adjustments.

Hypnotic drugs are the fourth most popular prescription drugs because the lack of sleep in the current population is a serious problem in Healthcare. In fact, people who suffer bad sleep quality have an increased risk of developing immune-related diseases and accumulating free radicals. Prevention of chronic diseases may be a better strategy than looking for treatments. Thus, risk reduction has become a subject of great interest to health professionals, scientists and to the food industry (Liu, 2003). Therefore, many functional foods are now designed with the objective of providing a high intake of active biomolecules and of reducing the risk of diseases associated with aging and oxidative stress. The term “functional food” refers to a food or ingredient capable of improving health and/or reducing the risk of diseases (Rafter, 2002). Moreover, there are foods that might be consumed in a normal diet to achieve beneficial effects that go beyond the established nutritional requirements (Roberfroid, 2002).

Given the sleep problems in society, the General Objective of this Doctoral Dissertation has been to analyze the benefits of non-alcoholic beer in the work/rest rhythm of diurnal animals (*Coturnix coturnix*), and the sleep/wake rhythm and mood in two groups of people under significant stress: nurse staff at the Infanta Cristina University Hospital (SES) and students at the University of Extremadura (UEX) during final exams. We studied the sedative and/or tranquilizer effect of hop in beer, but avoiding the effect that ethanol might have on the population in study.

This General Objective has broken down to the following **Specific Objectives**:

1. Assess the effects over the work/rest pattern on diurnal animals (*Coturnix coturnix*) after the administration of capsules containing hop extract (*Humulus lupulus*) with equal concentration to that contained in a non-alcoholic beer.
2. Evaluate the effects of non-alcoholic beer when ingested at dinner on sleep/wake rhythm and mood in two groups of people under stress:

- 2.1. In the nurse staffing at the Infanta Cristina University Hospital Complex (SES), where the following parameters were evaluated:
 - 2.1.1. Nocturnal sleep parameters through actimetry
 - 2.1.2. Nutritional analysis and food habits
 - 2.1.3. Antioxidant capacity in urine

- 2.2. In students at the University of Extremadura (UEX) under stress of final exams, where were analyzed:
 - 2.2.1. Anxiety and nocturnal sleep parameters by actimetry
 - 2.2.2. Subjective sleep quality
 - 2.2.3. Neuromolecules involved in anxiety: Cortisol, Serotonin and Melatonin

3. Material y Método



A continuación exponemos los resultados conseguidos en relación con los objetivos planteados anteriormente. Por razones de concisión y fidelidad al desarrollo experimental, estos resultados se incluyen en el formato original de las publicaciones a las que han dado lugar. En esta Tesis Doctoral no se han incluido datos preliminares o en fase experimental de desarrollo.

Y aunque cada artículo tiene su propia discusión, hemos creído apropiado incluir al final de este apartado otro de DISCUSIÓN GENERAL, dónde aportamos una visión conjunta de los resultados obtenidos, para poder concebir una visión integrada de los datos aquí presentados.

Now we show the results obtained about the objectives proposed before. For concision and accuracy to the development of the experiment, this results are included in the original format of the publications that were published. In this PhD the preliminary or experimental's phase results were not included.

And although every article has it's own discussion, we decided to include another GENERAL DISCUSSION section at the end of this part, where we give a goblal view of the final results, to obtain an integrated view of the given results.

1. Estudio con animales de hábitos diurnos (*Coturnix coturnix*), tras la ingesta de cápsulas con extracto de lúpulo (*Humulus lupulus*) con una concentración igual a la contenida en una cerveza sin alcohol, sobre el patrón actividad/reposo.

1. Study with animals of diurnal habits (*Coturnix coturnix*), after consuming capsules of Hops extract (*Humulus lupulus*) with the same concentration as one non-alcoholic beer, about activity/rest pattern.

The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm

L Franco¹, C Sánchez¹, R Bravo¹, A Rodríguez¹, C Barriga¹, JC Cubero^{1,2}

¹Research Group: Neuroimmunophysiology & Chrononutrition Department of Physiology, Science Faculty,

²Health Education Lab., Experimental Science Education Area, University of Extremadura, Badajoz, Spain

Received: November 27, 2011

Accepted after revision: February 14, 2012

The hop (*Humulus lupulus*), a component of beer, is a sedative plant whose pharmacological activity is due principally to its bitter resins, especially to the α -acid component 2-methyl-3-buten-2-ol. The mechanism of action of the resin of hop consists of increasing the activity of the neurotransmitter γ -aminobutyric (GABA), inhibiting the central nervous system (CNS). *Objectives:* To analyze in an experimental model of diurnal animal the sedative effect of hop, a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Methods:* Experiments were performed with common quail (*Coturnix coturnix*) similar to humans in the sleep-wake rhythm, isolated in 25 × 25 × 25 cm methacrylate cages, with food and water *ad libitum*, in a room with artificial ventilation (22 ± 1 °C) and a lighting cycle of 12L/12D (n = 5). The doses administered, close to the content of non-alcoholic beer, were 1, 2 and 11 mg extract of hop as one capsule per day, at 18:00 h for one week. A control group received capsules only with a methylcellulose excipient and a basal group received no treatment. The chronobiological analysis of the animals' activity captured and logged by the software DAS24 was performed using the Ritme computer program (cosinor methods). *Results:* With the dose of 2 mg, there was a statistically significant ($p < 0.05$) reduction of the arithmetic mean nocturnal activity (23 ± 3.0) with respect to the basal (38.56 ± 2.79), control (38.1 ± 2.8) and other doses groups 1 mg (52.04 ± 3.65) and 11 mg (47.47 ± 5.88). This dose of 2 mg, similar to the concentration in beer, was more effective in reducing nocturnal activity than the other doses of 1 and 11 mg, as well as preserving the circadian activity/rest rhythm. *Conclusion:* The concentration of 2 mg of hop extract effectively decreased nocturnal activity in the circadian activity rhythm. On the basis of this investigation, administration of non-alcoholic beer would be recommended due to its hop content and consequent sedative action, which would be an aid to nocturnal sleep.

Keywords: hops, nutrition, beer, sleep

Hops, beer and sleep

The hop (*Humulus lupulus*) is a plant used in the brewery industry for its aromatic characteristics. It has also traditionally been used for its soothing properties. Its sedative activity lies mainly in its bitter resins and in particular in the products of oxidative degradation, such as those resulting from the degradation of α -acids, a major example being 2-methyl-3-buten-2-ol (30). In addition to these bitter degradation products, there are other active components such as xanthohumol (17) and myrcenol (2). The main mechanism of the soothing action of hops is to increase the activity of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) by modulating brain GABA(A) receptors (17), thus inhibiting the central nervous system (CNS).

Corresponding author: Javier Cubero Juárez, PhD
Experimental Science Education Area, University of Extremadura
Av/de Elvas, sn, CP: 06071, Badajoz, Spain
Phone: +34-924 289300 / ext.: 86576; E-mail: jcubero@unex.es

This sedative effect of hops on the nervous system has been widely reported in animal model studies (4, 13, 30, 31), as also has the narcotic effect of high concentrations of hop extract due to its aforementioned 2-methyl-3-buten-2-ol component (9, 29).

Basic research on hops has been effectively applied to assisting the healthy human population to sleep (8, 28). For example, sedation treatment with valerian and hop combinations (22, 26) has been used to correct temporary sleep onset and sleep interruption disorders. The combination also satisfactorily improved sleep quality in clinical trials with insomnia patients (18) and with patients suffering from non-organic sleep disorder (11). These results reflect the action of components of hops on the inhibitory neurotransmitter GABA(A), an action which can also be exerted by other components of beer (2).

Added to the central effect of hops on GABA, there is an effect on another biomolecule, the hormone melatonin, an endocrine agent that entrains circadian rhythms (15). Neither must one ignore the effect on the neuronal receptors of adenosine which are extensively involved in the mechanism of sleep (1). Therefore, beer and its hop component could enhance the CNS's neuroendocrine response via GABA, adenosine and the indolamine melatonin with an effective sedative action that both entrains the sleep/wake rhythm and favours the induction of sleep.

In sum, beer has numerous components that may have the capacity to both entrain the rhythm of sleep and aid its induction. Given this context, the objective of the present work was to examine the possible sedative action of the levels of hops contained in normal beer and the effect on the activity/rest rhythm, in an animal model physiologically similar to humans in that it is active diurnally.

Methods

Animals

The experimental animals were female young adult quail (*Coturnix coturnix*) of approximately 5 months in age and body weight (b. w.) in the range 246.5–280.5 g ($n = 5$ per group). These diurnal birds, similar to the human in the sleep-wake rhythm, were housed isolated in cages measuring $25 \times 25 \times 25$ cm and fed *ad libitum*, in a room with artificial ventilation ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and lighting (light period from 07:00 to 19:00 h), as described by Sanchez et al. (24). The physiological parameters as the body weight of the animals throughout the trials were measured and also the cloacal temperature by inserting a thermometer to a depth of 3 cm into the cloaca (16).

The study was approved by the Ethical Committee of the University of Extremadura (Badajoz, Spain) in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Hops

Humulus lupulus dry extract (Joh. Barth & Sohn GmbH & Co., Mainburg, Germany) was administered daily for a week at 18:00 h (one hour before the onset of the dark period) in gelatine capsules containing 1, 2 and 11 mg (three different groups). The control group received gelatine capsules containing methylcellulose, daily for a week (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The basal group did not receive any treatment (their activity pulses were registered for a month). All treatments were performed in duplicate (except the basal group).

Measurement of the activity/rest rhythm

Each cage was equipped with an IR actimeter system to detect activity using two crossed perpendicular infrared beams situated on a plane 70 mm above the sustenance plane. Motor activity counts were automatically logged every 15 min onto a personal computer for each of 7 days of the different experimental groups, and analyzed using the program DAS24® (6, 23).

Chronobiological methods

The chronobiological analysis of the data was performed using the Ritme® for Windows software package. The rhythmicity of each group was studied by cosinor analysis (6). The sinusoidal function used for the fit (1) is the following:

$$y(t) = M + A \times \cos [(2 \times \pi/\tau) \times t - \Phi] \quad (1)$$

where $y(t)$ is the value of the cosine function at time t , M is the mean level of oscillation or the MESOR (acronym of Midline-Estimating Statistic Of Rhythm, the mean value about which the oscillation occurs, equal to the arithmetic mean of equidistant data covering a whole number of cycles), A is the amplitude (measure of the extent of a rhythmic change in a cycle as estimated by the sinusoidal function that best fits the data), π is the number pi and τ is the period (24 hours in our case) related to the angular frequency ($\omega = 2 \times \pi/\tau$) and Φ is the acrophase (a phase angle measuring the timing of the peak activity expressed as the lag from a reference time to the crest time of the best fit sinusoidal function). Hence, cosinor analysis determines the best-fitting sinusoidal wave by estimating three parameters: mesor, amplitude and acrophase.

Statistical methods

For the statistical analysis of the data, the software package Graphpad Prism® v. 5.0 was used. Two types of study were carried out:

1. Descriptive, calculating as representative values the arithmetic mean \pm standard deviation (SD) and/or confidence limits.
2. Hypothesis testing. Because of the available sample size, a Kolmogorov–Smirnov test was applied to check for the normality of the study variables. The population was found to be normal. The results were analyzed using the Tukey test for multiple comparisons of balanced groups, with the significance level taken to be $p < 0.05$.

Results

During the trials, the animals presented no sign of alteration in their physiological parameters. Their mean body weight and cloacal temperature of trials were 263.5 ± 17 g and $41.4 \pm 0.92^\circ\text{C}$ and none of the physiological parameters throughout the week did show significant statistical changes.

Measurements were made of the diurnal (07:00 to 19:00 h) and nocturnal (19:00 to 07:00 h) locomotor activity of the experimental groups administered the different concentrations of hop extract, the basal untreated group and the control group.

Figure 1 shows the nocturnal (19:00 to 07:00 h) motor activity during a week. It was significantly ($p < 0.05$) reduced with the administration of 2 mg of hop extract (23 ± 3) compared to the basal (38.56 ± 2.79), control (38.14 ± 2.78), 1 mg (54.04 ± 3.65) and 11 mg (47.47 ± 5.88) groups. Also, the 1 mg group showed a significant ($p < 0.05$) increase in activity relative to the basal group.

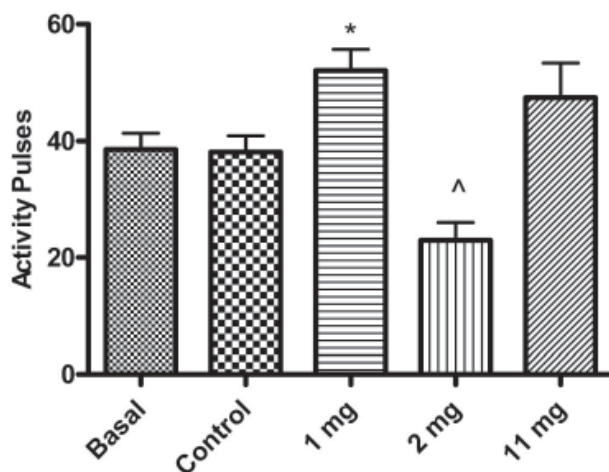


Fig. 1. The nocturnal (19:00–07:00 h) activity pulses (mean ± SE) recorded in each treatment group (1 mg, 2 mg, 11 mg, respectively, to 3.80, 7.60, 41.8 mg/kg b. w.) during a week. * $p < 0.05$ with respect to the basal value; ^ $p < 0.05$ with respect to the other groups ($n = 5$)

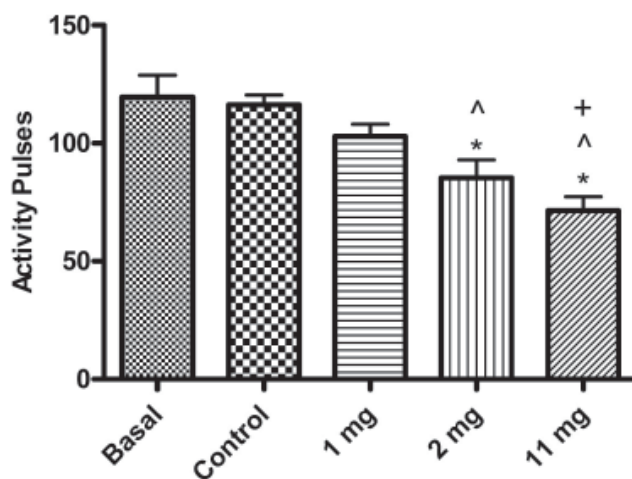


Fig. 2. The diurnal (07:00–19:00 h) activity pulses (mean ± SE) recorded in each treatment group (1 mg, 2 mg, 11 mg, respectively, to 3.80, 7.60, 41.8 mg/kg b. w.) during a week. * $p < 0.05$ with respect to the basal value; ^ $p < 0.05$ with respect to the control value; + $p < 0.05$ with respect to the 1 mg treatment ($n = 5$)

Figure 2 shows the results for the diurnal (07:00 to 19:00 h) motor activity during a week. The 2-mg dose group showed a significant ($p < 0.05$) decrease in motor activity (85.21 ± 7.71) compared to the basal (119.6 ± 9.22) and control (116.3 ± 4.15) groups. The 11 mg group also showed a significant ($p < 0.05$) reduction (71.46 ± 5.81) compared to the basal (119.6 ± 9.22), control (116.3 ± 4.15) and 1 mg (103 ± 5.12) groups.

Table I presents the results of the cosinor analysis of the chronobiological parameters for the different groups. There stands out the decline in the MESOR parameter after the 7 days administration of the 2 mg per day dose ($50.60 [45.21–56.04]$ activity pulses) compared with the other groups. The acrophase with this 2-mg dose remained unchanged (12:08 h [11:11 to 13:05 h]), being very similar to those of the other groups. Hence, as was the case with the nocturnal activity considered alone, the greatest decrease occurs with a dose rate of 2-mg hop extract per day, a dose that is similar to the hop content of beer.

Table I. Chronobiological parameters of each treatment group over a 24-hour period

Treatment	MESOR	Amplitude	Acrophase	p-value
Basal	76.14 (66.74–85.54)	69.49 (52.30–86.69)	11:09 (10:13–12:03)	0.000*
Control	78.96 (43.30–88.65)	60.65 (43.30–78.00)	12:02 (10:55–13:08)	0.000*
1 mg	75.83 (65.13–86.53)	41.54 (22.38–60.70)	12:13 (10:23–14:03)	0.000*
2 mg	50.62 (45.21–56.04)	39.54 (29.84–49.24)	12:08 (11:11–13:05)	0.000*
11 mg	58.88 (52.53–65.22)	17.03 (5.67–28.38)	12:41 (9.53–15:28)	0.003*

MESOR values and amplitudes are in the corresponding parameter units (activity pulses). Acrophases are given as times of day (07:00 h–19:00 h–07:00 h light-dark cycle). Confidence limits are in parentheses. The *p*-value indicates significance of the fit of the cosine curve to the data. * $p \leq 0.05$ was considered statistically significant ($n = 5$)

Discussion

The effect of hops on sleep has been amply confirmed in both experimental animal models and human clinical trials. A recent review is given by Zanolli (30). However, the levels of this Cannabaceae in beer would be sufficient to exert a sedative action in the organism?

In normal beer, the concentration of hops is about 0.3% (10). Therefore a moderate intake of beer of two 1/3-litre portions per day (666 ml), an amount recommended by several medical scientific societies (20, 24), would contribute about 2 g of hop extract equivalent per day, or 25.7 mg/kg in an average body weight human.

In the 1970s, Bravo et al. (3) showed that there was a significant decrease in motor activity in mice after the intraperitoneal administration of hop extract, although at high doses. Subsequently, its analgesic effect and the decrease in spontaneous motor activity were confirmed also in a mouse model, with there being an enhancement in the induction of sleep by pentobarbital (13).

Given that the average body weight of our experimental animals was 263.5 ± 17 g, the administration doses used in the experiment (1, 2 and 11 mg hop extract per capsule per day) were equivalent to 3.80, 7.60 and 41.80 mg/kg b. w. Our study showed an evident decline in motor activity over a 24-h period, reflected in the decreased values of the MESOR parameter with the 2 mg and 11 mg doses (which correspond to 7.60 mg/kg b. w. and 41.8 mg/kg b. w., respectively).

There is the drawback with the highest dose, however, that the decline in activity does not occur in the desired period, i.e., at night, but is delayed until the following diurnal period. Possibly, the bitter β -acid fraction of the hops is exerting its wakefulness action (31), an effect that appears to be controlled in our treatment with a 2 mg (7.60 mg/kg) dose since this produces the decline in activity after administration, i.e. at night, sedation that is maintained until the diurnal period, although to a lesser degree.

The present results in quail a diurnal animal model similar to the human in the sleep-wake rhythm, with the 2 mg dose having a sedative effect in both the nocturnal and diurnal periods, are consistent with the study reported by Zanolli et al. (32) in which the oral administration of hop extracts to mice achieved a reduction in spontaneous locomotor activity. In particular, those workers used an extract concentration of 10 mg/kg b. w., equivalent to 2 mg per animal. They observed its central sedative effect in the increased sleep time and reduced motility compared to their control animals. Thus, essentially the same doses were used in that experiment and in ours, giving results that are consistent with each other (4).

A substantially higher concentration of hop extract (800 mg/kg b. w. = 160 mg dose) administered in association with anaesthetics and hypnotics, such as ketamine, led to prolonged states of deep narcosis (27). Similarly, the product of the oxidative degradation of the α -acid content of fresh hops, 2-methyl-3-buten-2-ol, applied to mice at concentrations of 0.8 g/kg b. w. produced narcosis that lasted 8 hours (9).

The biphasic animal model used in the present study, the common quail, has, like humans, a nocturnal period of sleep and diurnal activity. The results thus suggest that, because of its hop content, beer may have a possible use as a sedative in humans. The mechanism would principally be by modulating the GABAergic response, in addition to the effects of the hop components myrcenol (2), xanthohumol and such α -acid derivatives (30) as 2-methyl-3-buten-2-ol.

The sedative property of hops has been confirmed in humans when acting in combination with valerian (*Valeriana officinalis*), with the two acting synergically on the sedative function (5, 8, 21, 22, 28). Schellenberg et al. (25) studied the combined effect of hops and valerian on the central adenosine mechanism, observing an increase in alpha waves on the EEG, with sleep inducers being generated through the adenosine receptors. To this action on adenosine (1), one must also add the effect on the CNS the hormone melatonin (12, 15), which are involved in sleep and circadian rhythms, respectively.

Through its hop content, alcohol-free beer could exert a sedative action in humans, apart from its benefits for health when consumed in moderation (14), among which are its anti-cancerogenous (7) and cardiovascular health (19) properties. One can therefore conclude that a moderate consumption of beer will favour night-time rest, due in particular to its hop components, in addition to its other confirmed benefits for the organism.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Plan I.D.T.I of the UEx, 2010, *Acción VII: Proyectos de Iniciación a la Investigación y el Desarrollo Tecnológico*, Consejería de Sanidad y Dependencia, Junta de Extremadura, Vicerrectorado de Investigación, Innovación e Infraestructura Científica, Universidad de Extremadura and to the *Centro de Información Cerveza y Salud* (CICS) for financial support for this study.

REFERENCES

1. Abourashed EA, Koetter U, Brattstrom A: *In vitro* binding experiments with a valerian, hops and the fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptor. *Phytomedicine* 11, 633–638 (2004)
2. Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, Yoshinobu K: Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2514–2519 (2006)
3. Bravo L, Cabo J, Fraile A, Jimenez J, Villar A: Estudio farmacodinámico del lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Acción tranquilizante. *Boll. Chim. Farm.* 113, 310–315 (1974)
4. Bravo R, Franco LF, Sánchez C, Rodríguez AB, Barriga C, Cubero J (2011): The sedative effects of hop (*Humulus lupulus*), a component of beer, in the rhythm of activity / rest. *Proceeding of the 11th European Nutrition Conference FENS*, Oct 26–29, 2011, Madrid, Spain
5. Brattstrom A: Scientific evidence for fixed extract combination (Ze 91019) from valerian and hops traditionally used as sleep-inducing aid. *Wien. Med. Wochenschr.* 21, 847–851 (2007)
6. De la Iglesia HO, Cambras T, Schwatz WJ, Diez-Noguera A: Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* 14, 796–800 (2004)
7. Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC: Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 30, 3333–3339 (2010)

8. Dimpfel W, Suter A: Sleep improving effects of a single dose administration of valerians/hops fluid extract a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in parallel design using electrohypnograms. *Eur. J. Med. Res.* 26, 200–204 (2008)
9. Hänsel R, Wohlfart R, Coper H: Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops II. *Z. Naturforsch. C.* 35, 1096–1097 (1980)
10. Hernández H (1999): *Tratado de Nutrición*. Edt. Diaz de Santos, Spain
11. Koether U, Schrader E, Kaufeler R, Brattstrom A: A randomized double blind, placebo-controlled, prospective clinical efficacy of fixed valerian hops extract combination (Ze 91019) in patients suffering from non-organic sleep disorder. *Phytother. Res.* 21, 847–851 (2007)
12. Kotronoulas G, Stamatakis A, Stylianopoulou F: Hormones, hormonal agents and neuropeptides involved in the neuroendocrine regulation of sleep in humans. *Hormone* 8, 232–248 (2010)
13. Lee KM, Jung KS, Song DK, Krauter M, Kim HY: Effects of *Humulus lupulus* extract on the central nervous system in mice. *Planta Med.* 59 (Suppl): A691 (1993)
14. Magalhanes PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA: Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat. Prod. Commun.* 4, 591–610 (2009)
15. Maldonado M, Moreno H, Calvo JR: Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clin. Nutr.* 28, 188–191 (2009)
16. Malheiros RD, Morales VM, Bruno DG, Malheiros EB, Furlan RL, Macari M: Environmental temperature and cloacal and surface temperature in broiled chicks in first week post hatch. *J. Appl. Poultry Res.* 9, 112–117 (2000)
17. Meissner O, Haberlein H: Influence of xanthohumol on the binding behaviour of GABA A receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Plant. Med.* 72, 656–658 (2006)
18. Morin CM, Koetter U, Bastien C, Ware JC, Wooten V: Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia; a randomized placebo-controlled clinical trial. *Sleep* 28, 1465–1471 (2005)
19. Negrão R, Costa R, Duarte D, Taveira Gomes T, Mendanha M, Moura L, Vasques L, Azevedo I, Soares R: Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *J. Cell Biochem.* 11, 1270–1279 (2010)
20. Romeo J, Warnberg J, Nova E, Ligia E, González-Gros, Marcos A: Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann. Nutr. Metab.* 51, 359–366 (2007)
21. Ross SM: Sleep disorders: a single dose administration of valerians/hops fluids extract (dormeasan) is found to be effective in improving sleep. *Holist. Nurs. Pract.* 23, 253–356 (2009)
22. Salter S, Brownie S: Treating primary insomnia the efficacy of valerian and hops. *Aust. Fam. Physician.* 39, 433–437 (2010)
23. Sanchez C, Barriga C, Rodríguez A, Franco L, Rivero M, Cubero J: Effects of oral administration of L-methionine on activity/rest rhythm. *Acta Physiol. Hung.* 97, 224–233 (2010).
24. Sanchez C, Bravo L, Rubio C, Rodríguez A, Barriga C, Cubero J: Cerveza y salud, beneficios sobre el sueño. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria* 16, 168–171 (2010).
25. Schellenberg R, Sauer S, Abourashed E, Koetter U, Brattstrom A: The fixed combination of valerian and hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med.* 70, 594–597 (2004)
26. Schmitz M, Jackel M: Comparative study for assessing quality of life of patients with exogenous sleep disorders (temporary sleep onset and sleep interruption disorders) treated with hops-valerian preparation and benzodiazepine drug. *Wien Med. Wochenschr.* 148, 291–298 (1998)
27. Schiller H, Foster A, Vonhoff C, Hegger M, Biller A, Winterhoff H: Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extract. *Phytomedicine* 13, 535–541 (2006)
28. Vonderheid-Guth B, Todorova A, Brattstrom A, Dimpfel W: Pharmacodynamic effects of valerian and hops extract combination (Ze 91019) on the quantitative-topographical EEG in the healthy volunteers. *Eur. J. Med. Res.* 5, 139–144 (2000)
29. Wohlfart R, Hansel R, Schmidt H: The sedative-hypnotic principle of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-ol. *Planta Med.* 48, 120–123 (1983)
30. Zanolli P, Zavatti M: Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 116, 383–396 (2008)
31. Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia R, Avallone R, Baraldi M: Evidence the β -acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J. Ethnopharmacol.* 109, 87–92 (2007)
32. Zanolli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Baraldi M: New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 102, 102–106 (2005)

2. Evaluar cómo actúa la cerveza sin alcohol, ingerida en la cena, sobre el ritmo sueño/vigilia y estado de ánimo en dos grupos de personas sometidas a estrés:

2. Assess how non-alcoholic beer acts, consumed during dinner, on the sleep/wake rhythm and mood in two groups of people under stress:

2.1. En el Personal Sanitario del Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES), en el que se evaluaron los siguientes parámetros:

2.1.1. Parámetros del sueño nocturno mediante activimetría

2.1. In the Hospital Nurse Personnel from Infanta Cristina University Hospital (SES), where the following parameters were evaluated:

2.1.1. Parameters of nocturnal sleep through activimetry

The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses

Lourdes Franco¹, Cristina Sánchez¹, Rafael Bravo¹, Ana B. Rodríguez¹, Carmen Barriga¹, Eulalia Romero², Javier Cubero^{1,3*}

1 Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, Department of Physiology, Faculty of Sciences, University of Extremadura, Badajoz, Spain, **2** SES, Hospital Universitario Infanta Cristina, Badajoz, Spain, **3** Laboratory of Health Education, Science Education Area, University of Extremadura, Badajoz, Spain

Abstract

Introduction: The hop (*Humulus lupulus* L.), a component of beer, is a sedative plant whose pharmacological activity is principally due to its bitter resins, in particular to the α -acid degradation product 2-methyl-3-buten-2-ol. The mechanism of action of hop resin consists of raising the levels of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory neurotransmitter acting in the central nervous system (CNS).

Objectives: To analyze the sedative effect of hops as a component of non-alcoholic beer on the sleep/wake rhythm in a work-stressed population.

Methods: The experiment was conducted with healthy female nurses (n=17) working rotating and/or night shifts. Overnight sleep and chronobiological parameters were assessed by actigraphy (*Actiwatch*[®]) after moderate ingestion of non-alcoholic beer containing hops (333 ml with 0,0% alcohol) with supper for 14 days (treatment). Data were obtained in comparison with her own control group without consumption of beer during supper.

Results: Actigraphy results demonstrated improvement of night sleep quality as regards the most important parameters: *Sleep Latency* diminished ($p \leq 0.05$) in the Treatment group (12.01 ± 1.19 min) when compared to the Control group (20.50 ± 4.21 min), as also did *Total Activity* ($p \leq 0.05$; Treatment group = 5284.78 ± 836.99 activity pulses vs Control = 7258.78 ± 898.89 activity pulses). In addition, anxiety as indexed by the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) decreased in the Treatment group (*State Anxiety* 18.09 ± 3.8 vs Control 20.69 ± 2.14).

Conclusion: The moderate consumption of non-alcoholic beer will favour night-time rest, due in particular to its hop components, in addition to its other confirmed benefits for the organism.

Citation: Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez AB, Barriga C, et al. (2012) The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses. PLoS ONE 7(7): e37290. doi:10.1371/journal.pone.0037290

Editor: Georges Chapouthier, Université Pierre et Marie Curie, France

Received: February 8, 2012; **Accepted:** April 17, 2012; **Published:** July 18, 2012

Copyright: © 2012 Franco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors gratefully acknowledge financial support for this study through the Plan I.D.T.I de la UEx, 2010 Acción VII, Proyectos de Iniciación a la Investigación y el Desarrollo Tecnológico; the Consejería de Sanidad y Dependencia, Junta de Extremadura; the Vicerrectorado de Investigación, Innovación e Infraestructura Científica, Universidad de Extremadura; and the Centro de Información Cerveza y Salud (CICS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jcubero@unex.es

Introduction

The hop (*Humulus lupulus* L.), a plant used for brewing because of its aromatic characteristics, has also traditionally been used as a soothing agent. Its sedative activity lies mainly in its bitter acids, and in particular in their oxidative degradation products such as that resulting from the α -acid content: 2-methyl-3-buten-2-ol [1]. Other active components such as the flavonoid xanthohumol are added to degradation products such as 2-methyl-3-buten-2-ol [2], and the terpene, myrcenol [3]. The main mechanism of action of hops is to increase the activity of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) through modulation of brain GABA(A) receptors [1]. The sedative effect of hops on the nervous system has been widely reported in research using animal models, as also has the narcotic effect at high concentrations due to the 2-methyl-3-[1,3,4,5] buten-ol component [6,7].

Basic research on hops has found effective applications in the healthy human population as an aid to sleep [8,9]. In addition to its use in people with sleep problems, the sedative action associated with the components of hops has been used to correct temporary sleep onset and sleep interruption disorders in human populations with treatments applying a combination of valerian and hops [10,11]. Clinical trials with hops gave satisfactory results as the improvement of sleep quality in patients with insomnia is concerned [12], and in patients suffering from non-organic sleep disorder [13]. Above all, it is also known that both hops and other derivatives of beer can have impact on the inhibitory neurotransmitter GABA(A) [1].

In addition to the central nervous effects of hops as far as GABAergic neurotransmission is concerned, hops does also affect serotonin (5-HT), a further neurotransmitter involved in nocturnal sleep regulation [14]. Moreover, 5-HT is involved as regards the

activation of the hormone melatonin, an endocrine agent that entrains circadian rhythms [14,15,16]. There are also effects of hops on the neuronal receptors of adenosine which are extensively involved in the mechanism of sleep [17]. Therefore, beer and its hop component are thought to enhance the CNS's neuroendocrine response via GABA, adenosine, and the biogenic amines serotonin and melatonin with an effective sedative action that both modulates the sleep/wake rhythm and favours the induction of sleep.

In general, there is an initial rejection of the notion that beer may be linked to health because it is a drink that is presumed to cause overweight. However, the caloric content of normal beer is 45 kcal per 100 ml. The caloric content of non-alcoholic beer, which was used in the present study, was relatively low with 17 kcal per 100 ml. Research indicated that moderate daily ingestion of a one-third of a litre tin of beer in women and two tins in men did not produce any significant change in weight [18].

In fact, some properties of beer are thought to have a positive impact on human health. These are thought to be due to the effects of certain components, as for example the aforementioned flavonoid xanthohumol. This compound in particular is thought to fight and prevent cancer as it inhibits the metabolic activation of procarcinogens, induces the activation of anti-cancerigenous enzymes, and inhibits tumour growth in early stages [19,20]. Other actions of this particular flavonoid include its effective anti-inflammatory effect in inhibiting prostaglandin synthesis via the cyclooxygenases COX-1 and COX-2. Moreover its suppression of the expression of nitric oxide synthase (NOS) whose prolonged activation can trigger the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) has been reported [21]. A further property is its antioxidant activity since in vitro xanthohumol has been found more effective than α -tocopherol. Finally a decrease in the tissue damage risk marker, the amino acid homocysteine (HCY), was found. As regards the effects of moderate beer intake major anti-arteriosclerotic, anti-inflammatory, and anti-thrombotic effects have been reported [22].

A further component of beer is 8-prenylaringenin, a phytoestrogen that acts beneficially on bone metabolism, increasing bone density in adults (both men and postmenopausal women), and is thus helpful in preventing or mitigating osteoporosis [23,24,25,26]. Beer can also act as an immunomodulator in healthy populations an increase in leukocytes and T-lymphocyte subpopulations, with this effect being stronger in females than in males), and beer was also shown to be involved in the production of certain cytokines (IL-2,-4,-6,-10; IFN- γ ; and TNF- α) and antibodies [27,28]. The β -bitter acids of the hops, together with myrcenol and xanthohumol, give beer its sedative effect, with their capacity to entrain circadian rhythms, favouring the induction of sleep.

Overall, there are components in beer that are thought to be beneficial to health, and some authors consider that some properties of beer could make it a candidate for possible use as a nutraceutical compound.

Given this context, the main objective of the present work was to study how the hops content of alcohol-free beer – since alcohol

Table 1. Characteristics ($X \pm SE$) of the study sample, (n = 17).

Age (yr)	Weight (kg)	Height (m)	BMI (kg/m ²)
40.9 \pm 2.56	62.4 \pm 2.80	1.61 \pm 0.10	24.4 \pm 1.29

doi:10.1371/journal.pone.0037290.t001

Table 2. Measures of work stress as assessed using the “Effort Reward Imbalance” (ERI) model.

Effort (E)	Reward (R)	Stress (E/R)	% Stress	Implication
14.84 \pm 0.46	36.34 \pm 0.65	0.93 \pm 0.04	81.5 \pm 3.45	15.4 \pm 0.73

Self Evaluation Questionnaire (Macias et al. 2003).

($X \pm SE$) for the study population (n = 17). Stress (E/R) > 0.7; high level of stress (E/R) > 1.

doi:10.1371/journal.pone.0037290.t002

is prejudicial to the quality of sleep [29,30] – may have a sedative action and affect the activity/sleep rhythm in a population subject working rotating and/or night shifts.

Materials and Methods

Subjects

The trial was conducted with a sample of 17 female volunteers on the nursing staff of the Extremadura Health Service (*Servicio Extremeño de Salud, SES*) who had at least one night shift per working week, and were subject to a high load of work and/or mood stress (as evaluated by means of a questionnaire on job-related stress; Macias et al. 2003). The volunteers were in good health, had normal body weight, and did not take any medications that might have influenced or masked the results of the study. Table 1 gives the anthropometric characteristics of the sample. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the University of Extremadura, and by the Ethics Committee of the Extremadura Health Service (*SES*).

Experimental Design

The experimental design chosen was one of longitudinal intervention in which each subject was her own control.

The trial period was 2 weeks of “Treatment”, in which the subject ingested 330 mL of alcohol-free beer (*San Miguel 0,0% alcohol*[®]) with supper.

Prior to starting the trial, the subjects had completed a questionnaire on job-related stress [31]. During the control week and at the end of the treatment with alcohol-free beer, they completed the STAI self-evaluation state-trait anxiety inventory (see below; Spielberger et al. 2008). Throughout the study period, the subjects wore an actimeter (*Activatch*[®]) on the non-dominant wrist. This recorded their daily activity, and allowed us to

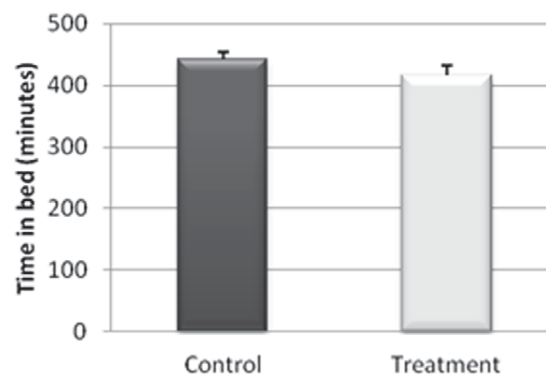


Figure 1. Time in bed during the night-time period of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$).

doi:10.1371/journal.pone.0037290.g001

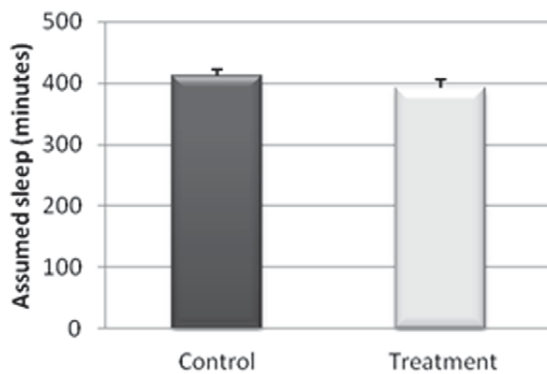


Figure 2. Assumed sleep (including the number of awakenings) of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$).

doi:10.1371/journal.pone.0037290.g002

determine the sleep parameters needed as inputs to the Sleep Analysis[®] v.5.4 software.

Parameters Studied

Work stress. Once subjects had given informed consent to participate in the study they were asked to complete the work stress questionnaire, as adapted and validated for the Spanish population by Macias et al., [32].

Since participants in the study had to be working under conditions of high stress, we made a quantitative evaluation of the effect of job stress on health in a representative sample of workers of the SES using the Effort Reward Imbalance (ERI) model of Siegrist validated for the Spanish population –“Desequilibrio Esfuerzo-Recompensa” (DER) by Macias et al., [32]. The questionnaire is self-administered and anonymous to ensure confidentiality. The time taken to complete the questionnaire was around 10 minutes.

The following variables were evaluated:

- Effort: The range of scores was from 5 to 25 points, with higher scores being indicative of greater effort experienced by the worker.
- Reward: The range of scores was from 11 to 55 points, with higher scores corresponding to greater job satisfaction.
- Level of Stress: This is the result of dividing extrinsic effort by reward. Participants with values >0.7 were considered to be “stressed”, and with values greater than unity “highly stressed”.
- %Stress: Corresponds to the percentage of the study population presenting stress at the beginning of the study.
- Involvement: A measure of how involved the worker feels in her job. The range of scores was from 6 to 24 points, with a higher the score being indicative for a greater the involvement.

State/trait anxiety. Anxiety was quantified using the “State-Trait Anxiety Inventory (Self Evaluation Questionnaire)” (Spielberger et al. 2008). This comprises separate self-assessment scales measuring the two independent concepts of anxiety (state and trait). The time taken to complete the questionnaire was around 10 minutes.

- State Anxiety (S/A): This refers to anxiety “at that specific time.” Conceptualized as a transitory, subjective, emotional

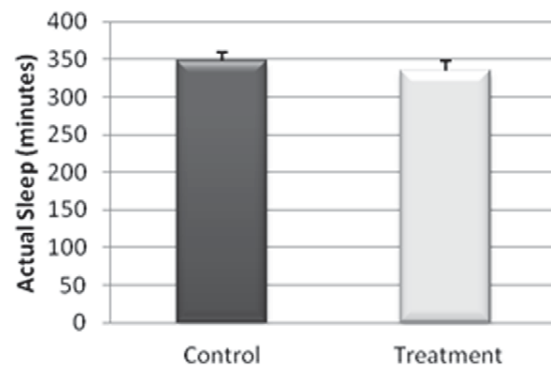


Figure 3. Minutes of real sleep during the night-time period of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$).

doi:10.1371/journal.pone.0037290.g003

state or condition of the human organism, of tension and apprehension, and hyperactivity of the autonomic nervous system.

- Trait Anxiety (T/A): This property is thought to reflect general” Anxiety. Conceptualized as a relative propensity to anxiety in which individuals differ in their tendency to perceive situations as threatening and consequently raise their state anxiety (S/A).

Sleep. Sleep related properties were assessed by means of the actimeters (*Activwatch*[®]) that the subjects wore on the non-dominant wrist throughout participation, and statistical techniques of time series [33,34]. analysis (Sleep Analysis[®] software), we studied the following sleep parameters:

- Time in bed: The time spent in bed.
- Assumed sleep: The difference between the end and the onset of sleep.
- Actual (Real) sleep time: Determined by algorithms, being equivalent to the assumed sleep time minus the time awake.
- Sleep latency: Time before the onset of sleep.
- Sleep-efficiency: The percentage of time asleep while the subject is in bed.
- Total activity: Total number of activity pulses during night-

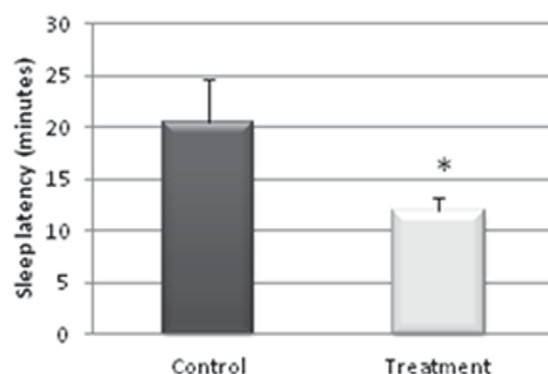


Figure 4. Sleep latency (minutes taken to fall asleep) during the night-time period of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$). (*) $p < 0.05$ with respect to the values obtained in the Control Week.

doi:10.1371/journal.pone.0037290.g004

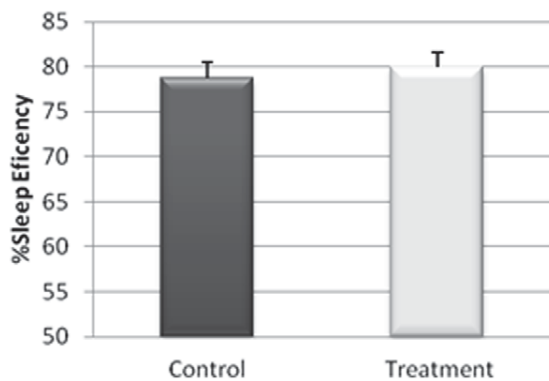


Figure 5. Nocturnal sleep efficiency of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$).
doi:10.1371/journal.pone.0037290.g005

time sleep.

Similarly, using the same actimeter, a non-parametric chronobiological analysis was made of the data [35], applicable to both sinusoidal and non-sinusoidal time series. With this type of analysis, we calculated:

- Interday stability: A measure of the variability of the circadian pattern over the study period. The closer the value to unity, the more robust the rhythm.
- Intraday variability: A measure of the fragmentation of the circadian rhythm; ≤ 2 .
- Relative amplitude: Difference between the mean of the 10 hours of greatest activity, and the mean of the 5 hours of minimum activity in the 24-hour average pattern.

Statistical analysis. The Kolmogorov–Smirnov test was applied for examining normality of the distribution of results. Once confirmed that the data did fulfill a normal distribution, Students t-test were used to analyze the results. Each value represents the mean $\pm SE$ from seventeen different volunteers. The degree of significance was set at $p < .05$. All analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.0, 2007; GraphPad Software, Inc; San Diego, CA).

Results

The results of the analysis of the levels of stress for the selection of this study population are given in Table 2. The mean value of the parameter determining stress (Effort/Reward) was 0.93 ± 0.04 . This confirmed that the participants were suffering from “stress” as the value was greater than 0.7, and indeed very close to 1, indicating a high level of job stress. Our population was thus indeed suitable for the objective of the study – to measure the evolution of the quality of sleep after the consumption of alcohol-free beer for 14 nights.

The actigraphy results for the study of the sleep/wakefulness rhythm are shown in Figures 1, 2, 3, 4, 5. They indicated that the quality of sleep improved relative to the control group during the two weeks of work stress with ingestion of alcohol-free beer. Although there was no difference in the amount of night-time sleep, the quality of sleep improved as shown by improvement in parameters of night-time sleep. In particular, sleep latency (time taken for the onset of sleep; Figure 4) diminished ($p \leq 0.05$) under treatment (12.01 ± 1.19 min) with respect to the control condition (20.50 ± 4.21 min), as also did total activity ($p \leq 0.05$; Figure 6;

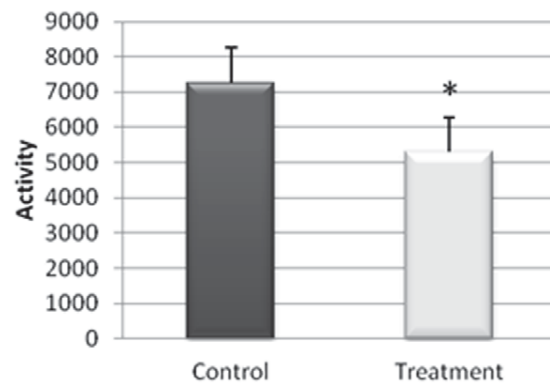


Figure 6. Total activity during the night-time period of each of the weeks, recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$). (*) $p < 0.05$ with respect to the values obtained in the Control Week.
doi:10.1371/journal.pone.0037290.g006

Treatment = 5284.78 ± 836.99 activity pulses vs Control = 7258.78 ± 898.89 activity pulses). In addition in Figure 7, the chronobiological analysis showed increased interday stability (0.51 ± 0.03) in the treatment relative to the control condition (0.45 ± 0.03). Following this ingestion of alcohol-free beer increased the quality of night-time sleep.

With respect to the change of the level of anxiety quantified by means of the STAI (Table 3), we observed that state anxiety (S/A) decreased following under treatment (18.09 ± 3.8) compared to the control period (20.61 ± 2.14).

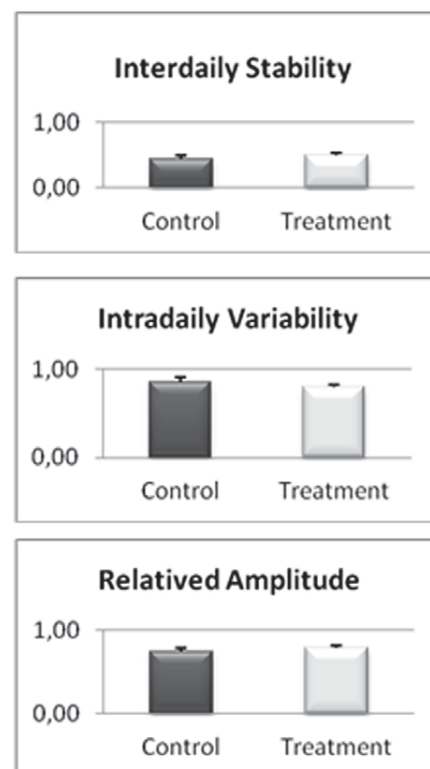


Figure 7. Non-parametric chronobiological parameter; interday stability, intraday variability, and relative amplitude of each of the weeks recorded for 17 work-stressed nurses ($X \pm S.E.$).

doi:10.1371/journal.pone.0037290.g007

Table 3. Anxiety measures using the “State-Trait Anxiety Inventory” (STAI).

State Anxiety (S/A)		Trait Anxiety (T/A)	
Control	Beer Treatment	Control	Beer Treatment
20.69±2.14	18.09±3.8	19.25±1.68	19.66±1.68

Self Evaluation Questionnaire (Spielberger et al. 2008). (X ± SE) for the study population (n=17). The 50th percentile for state anxiety: 21. The 50th percentile for trait anxiety: 21. doi:10.1371/journal.pone.0037290.t003

Discussion

The effects of hops on sleep modulation were confirmed in both experimental animal models and human clinical trials. A recent review is given by Zanolli & Zavatti [1]. But to what extent do the levels of the hops present in normal beer have a sedative effect on the organism?

In normal beer the concentration of hops is about 0.3% [36]. Therefore a moderate intake of beer of two 1/3-litre portions per day (666 ml), an amount recommended by several medical scientific societies [18,27,37], would contribute about 2 g of hops per day, or 25.7 mg/kg in an average weight human.

In the 1970s, Bravo et al., [38] showed that there was a significant decrease in motor activity in mice after intraperitoneal administration of hop extract, although at rather high doses. Subsequently, its analgesic effect and decrease in spontaneous motor activity were confirmed also in a mouse model, with there being an enhancement in the induction of sleep by pentobarbital [4].

The sedative property of hops has been confirmed in humans, being greater when acting in combination with valerian (*Valeriana officinalis*), with the two acting synergistically on sedative function [3,8,9,10,39,40]. Schellenberg et al., [17] studied the combined effects of hops and valerian on central nervous adenosine mechanism, observing an increase in alpha waves while assessing EEG data, with sleep inducers being generated through the adenosine receptors. To this action on adenosine, one must also add the hypnotic effect on the CNS through receptors for serotonin [16] and the hormone melatonin [14,15,41], which are involved in sleep and circadian rhythms, respectively.

Our study in a population of health professionals experiencing a considerable amount of work stress showed that, even though there was no increase in the length of repose in bed, there was a clear improvement in the quality of night-time sleep after the ingestion of beer at the end of the day. This is illustrated by the reduction in sleep latency and the notable reduction in nocturnal mobility, thereby achieving restful sleep which was reflected in decreased anxiety [42].

References

- Zanolli P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 116: 383–396.
- Meissner O, Haberlein H (2006) Influence of xanthohumol on the binding behaviour of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Plant Med* 72: 656–8.
- Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, et al. (2006) Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J Agric Food Chem* 54: 2514–1519.
- Lee KM, Jung KS, Song DK, Krauter M, Kim HY (1993) Effects of *Humulus lupulus* extract on the central nervous system in mice. *Planta Med* 59(Suppl): A691.
- Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, et al. (2007) Evidence the B-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J of Ethnopharmacol* 109: 87–92.
- Hansel R, Wohlfart R, Coper H (1980) Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops, II. *Z Naturforsch C* 35: 1096–1097.
- Wohlfart R, Hansel R, Schmidt H (1983) The sedative-hypnotic principle of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-ol. *Planta Med* 48: 120–123.
- Dimpfel W, Suter A (2008) Sleep improving effects of a single dose administration of valerian/hops fluid extract—a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in parallel design using electrohypnograms. *Eur J Med Res* 26: 200–204.

We would note that a greater hop content of the beer, but without increasing the alcohol content, could be expected to have led to a greater sedative action, both earlier and faster, in our population, but always at moderate doses since otherwise there could arise unwanted effects. The reason for this opinion is that other work, applying substantially higher *Humulus lupulus* concentrations (800 mg/kg = 160 mg dose), and in association with anaesthetics and hypnotics such as ketamine, led to prolonged states of deep narcosis [43]. Similarly, the product of the oxidative degradation of the α -acid content of fresh hops, 2-methyl-3-buten-2-ol, applied to mice at concentrations of 0.8 g/kg produced narcosis that lasted 8 hours [7]. In other study by Zanolli et al. [44], oral administration of hop extracts to mice achieved a reduction in spontaneous locomotor activity. In particular, extract concentrations of 10 and 20 mg/kg b.w. were used, and increased sleep time and reduced motility compared to control animals were observed.

In a biphasic animal model, the common quail (with, like humans, a nocturnal period of sleep and diurnal activity), we have studied the effect of hop extract concentrations similar to those in beer, observing a decrease in motor activity during the night [45].

The results thus suggest that, because of its hop content, beer may have a possible use as a sedative in humans. The mechanism would principally be by modulating the GABAergic response through the effects of the hop components myrcenol [3], xanthohumol, and such α -acid derivatives [1] as 2-methyl-3-buten-2-ol.

As with other food components, beer should always be only moderately consumed. Its use in this way and at supper-time could and should represent a nutritional tool in the discipline of chrononutrition, since its neuromodulatory components help entrain the circadian sleep/wake rhythms [34]. Thus future lines of research will be to examine the possibility of achieving a higher level of sedation and reducing anxiety with the ingestion at supper-time of alcohol-free or low alcohol content beer with a higher hop content than we tested in the present work.

Through its hop content, alcohol-free beer could exert a sedative action in humans, apart from its benefits for health when consumed in moderation [24], among which are its anticarcinogenic [46] and cardiovascular health [23,47,48] properties. One can therefore conclude that a moderate consumption of non-alcoholic beer will favour night-time rest, due in particular to its hop components, in addition to its other confirmed benefits for the organism.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC ER. Performed the experiments: LF CS RB. Analyzed the data: JC LF CS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JC CB ABR ER. Wrote the paper: JC CB. Recruited population: ER.

9. Vonderheid-Guth B, Todorova A, Brattstrom A, Dimpfel W (2000) Pharmacodynamic effects of valerian and hops extract combination (Ze 91019) on the quantitative-topographical EEG in the healthy volunteers. *Eur J Med Res* 5: 139–144.
10. Salter S, Brownie S (2010) Treating primary insomnia—the efficacy of valerian and hops. *Aust Fam Physician* 39: 433–7.
11. Schmitz M, Jackel M (1998) Comparative study for assessing quality of life of patients with exogenous sleep disorders (temporary sleep onset and sleep interruption disorders) treated with hops-valerian preparation and benzodiazepine drug. *Wien Med Wochenschr* 148: 291–298.
12. Morin CM, Koetter U, Bastien C, Ware JC, Wooten V (2005) Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia; a randomized placebo-controlled clinical trial. *Sleep* 28: 1465–1471.
13. Koetter U, Schrader E, Kaufeler R, Brattstrom A (2007) A randomized double blind, placebo-controlled, prospective clinical efficacy of fixed valerian hops extract combination (Ze 91019) in patients suffering from non-organic sleep disorder. *Phytother Res* 21: 847–851.
14. Abourashed EA, Koetter U, Brattstrom A (2004) In vitro binding experiments with a Valerian, Hops and the fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptor. *Phytomedicine* 70: 633–638.
15. Maldonado M, Moreno H, Calvo JR (2009) Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clin Nutr* 28: 188–191.
16. Weeks BS (2009) Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian. *Med Sci Monit* 15: 256–262.
17. Schellenberg R, Sauer S, Abourashed E, Koetter U, Brattstrom A (2004) The fixed combination of valerian and hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med* 70: 594–597.
18. Romero J, Gonzalez-Gross M, Warnberg J, Diaz LE, Marcos A (2007a) Does beer have an impact on weight gain? Effects of moderate beer consumption on body composition. *Nutr Hosp* 22: 223–228.
19. Stevens JF, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry* 65: 1317–1330.
20. Monteiro R, Calhau C, Oliveira e Silva A, Pinheiro-Silva S, Guerreiro S, et al. (2008) Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J Cell Biochem*. 104: 1699–1707.
21. Figard H, Girard C, Mougin F, Demougnot C, Berthelot A (2008) Effects of aqueous hop (*Humulus lupulus* L) extract on vascular reactivity in rats: mechanisms and influence of gender and hormonal status. *Phytother*. 15: 185–93.
22. Magalhães PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA (2009) Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun* 45: 591–610.
23. Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, et al. (2002) Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen 8-prenylaringenin. *Reproduction* 123: 235–242.
24. Rosenblum ER, Campbell M, Van Thiel D, Gavalier JS (1993) Isolation and identification of phytoestrogens from Beer. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1207–9.
25. Tucker KL, Jugdaohsing R, Powell JJ, Qiao Nigh, Hannan MT, et al. (2009) Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr* 89: 1188–1196.
26. Pedrera JD, Lavado JM, Roncero R, Calderon J, Rodriguez T, et al. (2009) Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition* 25: 1057–1063.
27. Romeo J, Warnberg J, Nova E, Ligia E, González-Gros, et al. (2007b) Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann Nutr Metab* 51: 359–66.
28. Romeo J, Warnberg R, Diaz LE, Gonzalez-Gross M, Marcos A (2007c). Effect of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem*. 63: 153–9.
29. Mellman TA (2006) Sleep and anxiety disorders. *Psychiatr Clin North Am* 29: 1047–1058.
30. Uhde TW, Cortese BM, Vedeniapin A (2009) Anxiety and sleep problems: emerging concepts and theoretical treatment implications. *Curr Psychiatry Rep* 11: 269–76.
31. Macias MD, Fernández-López JA, Hernández-Mejías R, Cueto-Espinar A, Rancano I, et al. (2003) Evaluación del estrés laboral en trabajadores de un hospital público español. Estudio de las propiedades psicométricas de la versión española del modelo “Desequilibrio Esfuerzo Guión Recompensa”. *Med Clin* 120: 138–143.
32. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE (2008) STAI Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo. Publicaciones de Psicología Aplicada. 7th ed. Madrid. TEA Publishers.
33. Cubero J, Narciso D, Terrón P, Rial R, Esteban S, et al. (2007) Chrononutrition applied to formula milks to consolidate infants’ sleep/wake cycle. *Neuro Endocrinol Lett* 28: 360–366.
34. Cubero J, Chancelón B, Sánchez S, Rivero M, Rodríguez AB, et al. (2009) Improving the quality of infant sleep through the inclusion at supper of cereals enriched with tryptophan, adenosine-5'-phosphate, and uridine-5'-phosphate. *Nutr Neurosci* 12: 272–80.
35. Eus JW, Van Someren EJ, Kessler A, Mirmiran M, Swaab DF (1997) Indirect bright light improves circadian rest-activity rhythm disturbances in demented patients. *Biol Psychiatry* 41: 955–963.
36. Hernández M, Sastre A (1999) Tratado de Nutrición. 1st ed. Madrid. Díaz de Santos S.A. Publishers.
37. Sánchez C, Bravo L, Rubio C, Rodríguez A, Barriga C, et al. (2010) Cerveza y salud, beneficios sobre el sueño. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 16: 168–171.
38. Bravo L, Cabo J, Fraile A, Jimenez J, Villar A (1974) Estudio farmacodinámico del lúpulo (*Humulus lupulus* L). Acción tranquilizante. *Boll Chim Farm* 113: 310–315.
39. Cornu C, Remontet L, Noel-Baron F, Nicolas A, Feugier-Favier N, et al. (2010) A dietary supplement to improve the quality of sleep: a randomized placebo controlled trial. *Complement Altern Med* 22: 10–29.
40. Ross SM (2009) Sleep disorders: a single dose administration of valerians/hops fluids extract (dormeesan) is found to be effective in improving sleep. *Holist Nurs Pract* 23: 253–6.
41. Kotronoulas G, Stamatakis A, Stylianopoulou F (2010) Hormones, hormonal agents, and neuropeptides involved in the neuroendocrine regulation of sleep in humans. *Hormone* 8: 232–248.
42. Bravo R, Franco LF, Sánchez C, Rodríguez AB, Barriga C, et al. (2011a) The sedative effects of hop (*Humulus lupulus*), a component of beer, in the rhythm of activity/rest. Proceeding of the 11th European Nutrition Conference FENS; Oct 26–29, 2011; Madrid, Spain. *Ann Nutr Metab*.
43. Schiller H, Foster A, Vonhoff C, Hegger M, Biller A, et al (2006) Sedating effects of *Humulus lupulus* L extract. *Phytomedicine* 13: 535–541.
44. Zanolli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Baraldi M (2005) New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J of Ethnopharmacol* 102: 102–106.
45. Bravo R, Franco LF, Sánchez C, Romero E, Barriga C, et al. (2011b) The sedative effect of hop (*Humulus lupulus*), a component of beer, in a stressed population. Proceeding of the 11th European Nutrition Conference FENS; Oct 26–29, 2011; Madrid, Spain. *Ann Nutr Metab*.
46. Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, et al. (2010) Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 30: 3333–3339.
47. Klatsky AL (2007) Alcohol, cardiovascular diseases and diabetes mellitus. *Pharmacol Res* 55: 237–247.
48. Negrao R, Costa R, Duarte D, Taveira Gomes T, Mendanha M, et al. (2010) Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *J Cell Biochem* 111: 1270–1279.

2.1.2. Análisis nutricional y hábitos alimentarios

2.1.2. Nutritional analysis and food habits

Análisis nutricional y hábitos alimentarios en personal sanitario con turnos rotatorios

Lourdes Franco Hernández¹, Rafael Bravo Santos¹, Cristina Lucía Sánchez López¹, Eulalia Romero², Ana Beatriz Rodríguez Moratinos¹, Carmen Barriga Ibars¹, Javier Cubero Juárez^{1,3}

¹Grupo de Investigación: Neuroinmunofisiología y Crononutrición. Facultad de Ciencias. ²Directora de Enfermería. Hospital Universitario Infanta Cristina. (SES). Badajoz. ³Laboratorio de Educación para la Salud. Área de Dca. Ciencias Experimentales. Facultad de Educación. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

Recibido: 29.12.2011
Aceptado: 21.2.2012

Resumen

Fundamentos: Todavía son poco conocidas las especificidades que la organización alternada de turnos de trabajo puede representar para la salud y en particular para la alimentación y nutrición. El objetivo de este trabajo fue analizar los hábitos alimenticios y nutricionales en profesionales con turno rotatorios.

Métodos: Se enrolaron 15 mujeres, personal sanitario, voluntarias sanas con normopeso. Rellenaron un recordatorio de 24 h y un cuestionario de frecuencias autocompletadas diariamente, de forma exhaustiva, con los alimentos consumidos durante 7 días. El análisis dietético y nutricional fue llevado a cabo mediante: *Programa DIAL*.

Resultados: La ingesta de energía fue superior a la recomendada ($2209,13 \pm 16,4$ Kcal), así como proteínas ($96,15 \pm 6,88$ g), y lípidos ($108,29 \pm 8,61$ g), con un alto consumo de raciones diarias de aceites y grasas, lácteos y carnes y pescados. La ingesta de hidratos de carbono fue menor ($192 \pm 14,37$ g) de la recomendada, con un mejor consumo en raciones de cereales y azúcares. La ingesta de las vitaminas niacina, B₁₂, C y K, así como sales minerales, especialmente sodio y fósforo, fueron superiores al doble de las CDR. Se detectaron deficiencias nutricionales en su dieta diaria para zinc, hierro, yodo, magnesio y ácido fólico, e ingestas muy por debajo del CDR para flúor, potasio, calcio y vitamina D.

Conclusión: El colectivo estudiado sometido a turnos rotatorios mantuvo una dieta no equilibrada que debería balancearse hacia los hidratos de carbono, además de corregir el consumo diario deficiente en calcio y excesivo en sodio, factores de riesgo para la osteoporosis e HTA respectivamente.

Palabras clave:

Nutrición. Personal sanitario.
Turnos rotatorios.
Alimentación.

Key words:

Health care providers.
Rotating shift work. Food.

Nutritional assessment and food habits in health personnel in shift work

Summary

Foundations: There is limited knowledge about the impact of alternated shift work for health and nutrition. Our aim was to analyze the food and nutritional habits in health professionals with shift work rotation.

Methods: Some 15 voluntary healthy women, health personnel, with normal weight were recruited. They completed a 24-hour dietary recall and a daily Food Frequency Questionnaire for 7 days. Nutrient analysis was performed with *DIAL software*.

Results: The study group had energy intakes above recommendations (2209.13 ± 16.4 Kcal), as well as proteins (96.15 ± 6.88 g) and lipids (108.29 ± 8.61 g), with high consumption for oils and fats, dairies and meats and fish, and intakes below recommendations for carbohydrate (192 ± 14.37 g), with lower consumption for cereals and sweets. Regarding macro and micronutrients, intakes for vitamins niacin, B₁₂, C and K as well as for sodium and phosphorus were above twofold of the RDA. Intakes for zinc, iron, iodine, magnesium and folic acid, as well as for fluoride, potassium, calcium and vitamin D were far below RDA.

Conclusion: The study group under rotating shift work had an unbalanced diet, which should turn into higher carbohydrate intake and adequate intakes for calcium, now deficient, and excessive sodium intake, risk factors for osteoporosis and high blood pressure, respectively.

Correspondencia: Lourdes Franco

University of Extremadura. Av. de Elvas, s/n. 06071 Badajoz (España). E-mail: loudesfh@unex.es

Introducción

El ser humano está sometido a una serie de ciclos que controlan su comportamiento y sus actividades fisiológicas. Estos ritmos pueden ser ultradiarios, que son aquellos ritmos con una frecuencia menor de 24 horas como puede ser la respiración o la frecuencia cardíaca; circadianos, que son los que tienen una frecuencia aproximada de 24 horas: como la temperatura o los ritmos sueño/vigilia; infradiarios los que tienen frecuencia aproximada de 28 días como el ciclo menstrual; y por último los estacionales o circanuales que son los que tienen una frecuencia de 365 días, como la hibernación¹.

Todos los seres vivos disponen de un sistema capaz de medir el tiempo, de un reloj biológico que controla sus funciones, tanto en lo que se refiere a variables bioquímicas, fisiológicas, como de conducta. La ritmicidad es, de este modo, una de las propiedades fundamentales de los seres vivos^{2,3}. Uno de los ritmos más importantes es el ritmo circadiano sueño/vigilia. El sueño es una necesidad humana básica, un proceso universal común a todas las personas. El sueño se considera como un estado de alteración de la conciencia en el que la percepción y la reacción al ambiente del paciente están disminuidas. El sueño se caracteriza por una actividad física mínima, niveles variables de conciencia, cambios en los procesos fisiológicos orgánicos y disminución de la respuesta ante estímulos externos⁴. El deterioro de la salud física se manifiesta, en primer lugar, por alteración de los hábitos alimentarios y trastornos del sueño, y más a largo plazo, por alteraciones cardiovasculares y neuropsíquicas⁵. Existe evidencia científica que sostiene que el modo de vida alimentario puede tener un impacto muy importante en la mayor parte de las causas de morbilidad y mortalidad⁶. La educación de los hábitos alimentarios debe comenzar en la temprana infancia⁷.

A pesar de lo anterior, la rotación de turnos laborales es utilizada como alternativa a la permanente inversión de los ritmos humanos naturales impuesta por turnos fijos como el nocturno, entre tanto, todavía son poco conocidas las especificidades que la organización alternada de turnos de trabajo puede representar para, la salud y de particular para la alimentación y la nutrición. Algunos estudios científicos señalan que el tipo de turno laboral influye en el estado de salud de las personas; es así como en los funcionarios con turnos nocturnos se ha descrito una mayor susceptibilidad a presentar de manera temprana perturbaciones en los hábitos alimentarios, reducción de la magnitud de las oscilaciones circadianas y ultracircadianas⁸, en las concentraciones de insulina y leptina⁹, y un mayor riesgo nutricional de padecer estados de sobrepeso u obesidad¹⁰, además presentan un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles¹¹ y estados de fatiga que contribuyen a niveles reducidos de actividad física, y problemas sociales¹². En otras palabras, la vida y la salud del trabajador es constituida a partir de la dinámica de trabajo, a veces resultante de aspectos de orden organizacional.

En este contexto, abordaremos la cuestión de la alternancia de turnos, que en un grupo específico de trabajadores, contribuirá para que se pueda tener una nueva perspectiva sobre esa forma de organización temporal del trabajo tan actual y presente en diversos sectores productivos y de prestación de servicios¹³.

Según gran cantidad de estudios como el DRECE¹⁴, el Framingham¹⁵ o el BuilBloodPressureStudy¹⁶, la dieta mediterránea se plantea como un modelo de alimentación saludable¹⁷. Hay dificultades para definir con precisión cuál es la composición de la dieta mediterránea¹⁸ dado que entre los países mediterráneos y entre regiones existen ciertas diferencias. A pesar de estas diferencias, se acepta como rasgos comunes¹⁹ un alto consumo de vegetales crudos y cocidos, frutas frescas, legumbres y cereales, un alto consumo de aceite de oliva, un moderado consumo de leche y productos lácteos, especialmente en forma de queso, un bajo consumo de carne y un moderado consumo de alcohol, especialmente en forma de vino y cerveza²⁰. A estos componentes debemos agregar, al menos en España, un alto consumo de pescado^{21,22}.

Teniendo en cuenta todas estas premisas nos propusimos analizar los hábitos alimenticios y nutricionales de profesionales sanitarios en turnos rotatorios.

Método

Población a estudio

Se enroló una muestra de 15 mujeres voluntarias sanas con normopeso. Todas ellas personal sanitario (auxiliares, ATS/DUE y facultativo) del *Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES)* Badajoz, con las características antropométricas descritas en la Tabla 1.

El estudio fue aprobado por el *Comité Bioético Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES)*.

Análisis nutricional y dietético

Encuesta recordatorio autocompletada diariamente con los alimentos consumidos de forma exhaustiva durante 7 días. Para

Tabla 1. Descripción de parámetros antropométricos del colectivo

Parámetro antropométrico	Media	Desviación Estándar
Edad (años)	40,9	10,5
Altura (m)	1,61	0,07
Peso (kg)	62,4	11,5
IMC (kg/m ²)	24,4	5,3

(N=15).

Tabla 2. Frecuencia de consumo semanal por grupos de alimentos

Grupo de Alimentos	Media	Desviación Estándar
Grupo 1: Cereales, patatas, azúcar		
Chocolate: tableta, bombones	3,14	2,00
Cereales inflados de desayuno	2,5	1,91
Galletas tipo "María"	3,87	2,32
Galletas con chocolate, crema	3,00	2,1
Magdalenas, bizcocho	2,22	2,05
Ensamada, Donut, croissant	3,5	2,64
Pan (en bocadillo, con las comidas...)	6,73	0,83
Patatas al horno, fritas o hervidas	2,6	1,22
Arroz blanco, paella	1,65	1,32
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis...	1,82	1,43
Golosinas: gominolas, caramelos...	2,54	1,69
Grupo 2: Lípidos, mantequillas, aceites y grasas en general		
Croquetas, empanadillas, pizza	1,57	0,94
Bolsas de aperitivos ("chips", "fritos")	1,67	1,58
Grupo 3: Lácteos y derivados		
Leche	6,92	0,38
Yogurt	4,24	2,47
Queso blanco o fresco (Burgos...)	3,48	1,88
Otros quesos: curados o semi, cremosos	3,13	1,79
Postres lácteos: natillas, flan, requesón	2,00	1,96
Postres de crema o chocolate	3,25	2,22
Helados	2,20	2,17
Grupo 4: Cárnicos, huevos y pescados		
Huevos	2,46	1,47
Pollo o pavo	2,65	1,72
Ternera, cerdo, cordero (bistec, empanada...)	2,26	1,04
Carne picada, longaniza, hamburguesa	1,36	0,63
Jamón salado, dulce, embutidos	3,26	1,77
Pescado blanco: merluza, mero...	2,36	1,29
Pescado azul: sardinas, atún, salmón...	2,37	1,34
Marisco: mejillones, gambas, calamares...	1	0
Legumbres: lentejas, garbanzos, judías	2,37	1,36
Frutos secos: cacahuets, almendras...	2,5	1,96
Grupo 5: Hortalizas y verduras		
Sopas y cremas	2,04	1,56
Ensalada: lechuga, tomate, escarola...	4,67	2,23
Judías verdes, acelgas o espinacas	3,08	2,08
Verduras de guarnición: champiñones	2,74	2,00
Grupo 6: Frutas		
Frutas cítricas: naranja, mandarina...	4,45	2,52
Otras frutas: manzana, pera, plátano...	4,86	2,29
Frutas en conserva (en almibar...)	4,00	4,24
Zumos de fruta natural	2,22	1,99
Zumos de fruta comercial	3,33	2,87
Grupo 7: Bebidas		
Bebidas azucaradas	3,06	1,88
Bebidas bajas en calorías	3,30	1,77
Vino, sangría	2,00	1,22
Cerveza	3,21	2,04
Cerveza sin alcohol	3,15	1,34
Bebidas destiladas: whisky, ginebra, coñac	0,00	0,00

ello se les facilitaba una plantilla para cada día, *ERD-24h*^{23, 24}. Además, se realizó el *Cuestionario de Frecuencias* de consumo alimentario²⁵ a cada una de las voluntarias donde nos indicaban las raciones que ingerían de cada alimento, estudio semicuantitativo. Una vez recogidos los datos estos fueron analizados mediante software: *Programa DIAL*® analizando tres días no consecutivos incluyendo uno festivo^{23,26}.

Análisis estadístico

Mediante el análisis de estadística descriptiva: Media y Desviación Estándar mediante Software: *GraphPadPrism 5*.

Resultados

Comenzaremos exponiendo los resultados de las raciones consumidas por nuestra población a estudio tras completar y analizar el Cuestionario de frecuencias, y a partir de la cual se ha analizado sus raciones diarias y se han comparado con las Raciones Diarias Recomendadas (RDR), para cada una de los 7 grupos de alimentos, representados en las siguientes figuras. Los grupos se elaboraron según las indicaciones de la página web de la SERCA.

Como puede observarse en la Figura 1, nuestra población a estudio de profesionales sanitarios con turnos rotatorios, para el grupo 1 de alimentos; cereales, patatas y azúcar consumieron $3,05 \pm 1,39$ ($X \pm DS$) es decir 1,95 más de las recomendadas (RDR) ya que para este grupo debería haber sido 5 raciones diarias.

En este caso, en la Figura 2, Las voluntarias consumieron $2,12 \pm 0,78$ raciones. Para este grupo que comprende mantequillas, aceites y grasas, las RDR según las tablas de FAO-OMS (1975), de Vivanco y Palacios (1984), y de Grande Covián (1988), no se especifican, se recomienda consumir con moderación, 1 RDR²⁷.

La Figura 3 representa como las raciones de proteínas y lácteos consumidas eran $3,06 \pm 1,65$ mientras que las RDR son 2,5. Respecto a la Figura 4 las raciones ingeridas igualaron a las recomendadas. Como podemos observar en la Figura 5 las raciones ingeridas de los alimentos del grupo 5 supera a las RDR en $3,13 \pm 1,11$, ya que deberían ser 2. En el caso del grupo de alimentos número 6 la RDR fue de 2,5 y la ingerida por nuestras voluntarias fue de $3,77 \pm 1,04$. En cuanto al grupo 7, el de bebidas alcohólicas la cantidad ingerida ($2,45 \pm 1,29$) superó en 2 a las raciones diarias recomendadas pero esto ocurre porque en este grupo se incluyen todo tipo de bebidas, no sólo alcohólicas sino también refrescos.

En la Tabla 3 se observa cómo las voluntarias consumieron diariamente más energía. Referente a los macronutrientes se observa una mayor ingesta para proteínas ($96,15 \pm 6,88$ g) y lípidos ($108,29 \pm 8,61$ g) respecto a sus correspondiente CDR ($73,01$ g y $75,71$ g). El mayor consumo nos lo encontramos en los lípidos;

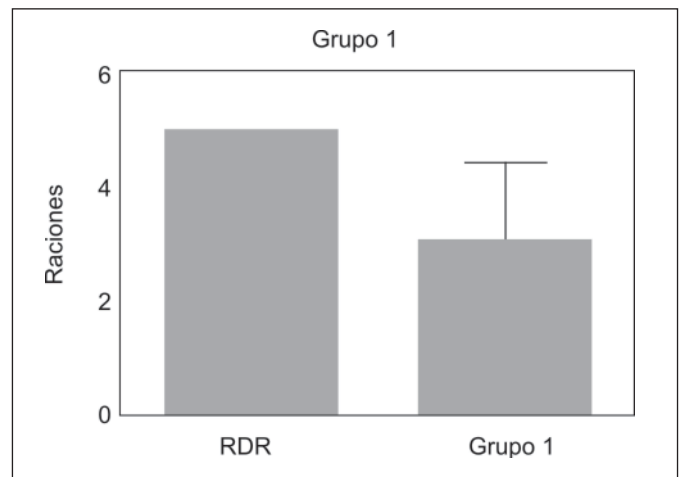


Figura 1. RDR del Grupo 1 (Cereales, patatas, azúcar) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

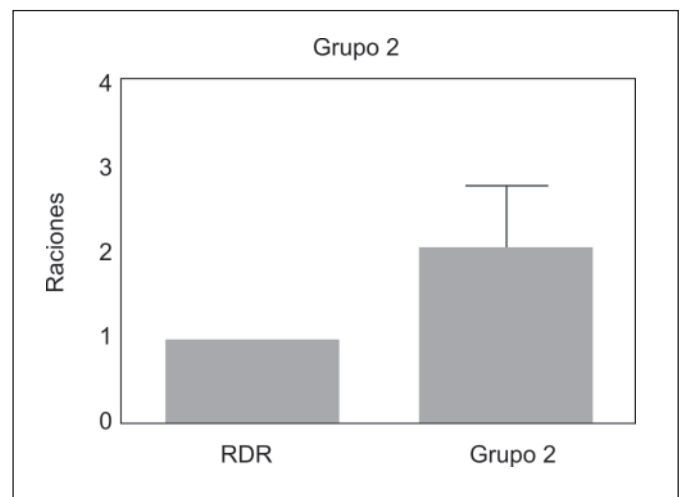


Figura 2. RDR del Grupo 2 (Lípidos, mantequillas, aceites y grasas en general) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

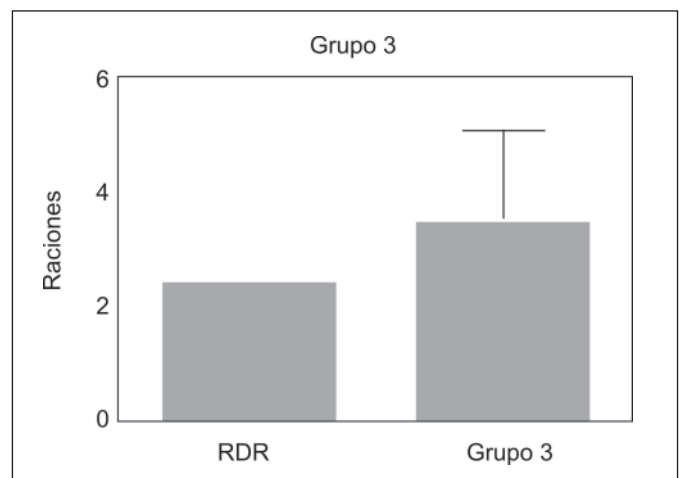


Figura 3. RDR del Grupo 3 (Lácteos) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

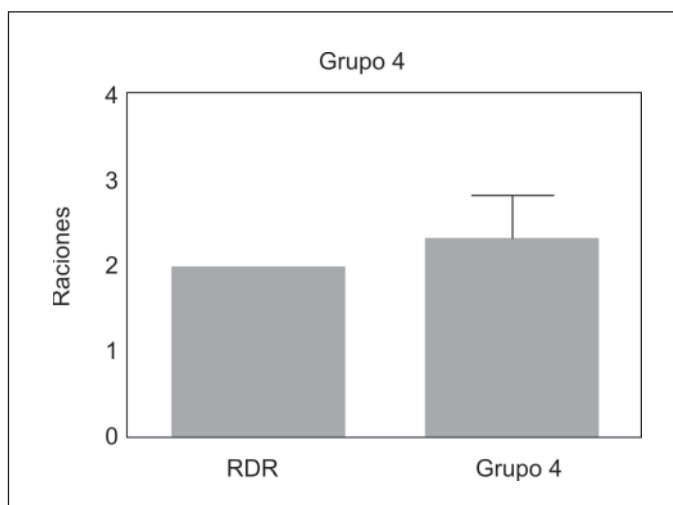


Figura 4. RDR del Grupo 4 (Cárnicos, huevos y pescados) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

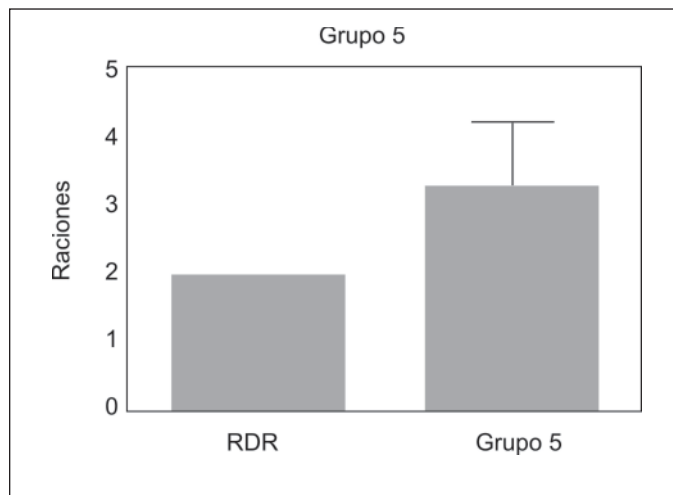


Figura 5. RDR del Grupo 5 (Hortalizas y verduras) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

Tabla 3. Ingesta estimada de energía y nutrientes

	Media	DE	CDR
Energía (Kcal)	2209,13	16,44	1905,89
Proteínas (g)	96,15	6,88	73,01
Hidratos de Carbono (g)	192	14,37	243,36
Lípidos (g)	108,29	8,61	75,71
AGM (g)	50,22	4,10	17

AGM ya que deben consumir 17 g frente a los 50,22±4,10 g que consumen. En cuanto a los hidratos de carbono la cantidad ingerida fue menor (192±14,37 g) a la recomendada (243,36 g).

Tabla 4. Ingesta estimada de vitaminas y minerales

Nutriente	Media	DE	CDR
Tiamina (B1) (mg)	1,39	0,13	0,1
Riboflavina (B2) (mg)	1,8	0,11	1,2
Niacina (mg)	38,19	2,19	15
Vitamina B6 (mg)	2,00	0,15	1,3
Vitamina B12 (µg)	4,97	0,55	2,4
Ácido fólico (µg)	243,27	30,77	400
Vitamina C (mg)	102,42	13,79	60
Vitamina A (µg)	919,73	146,40	800
Vitamina D (µg)	1,91	0,33	5 (µg)
Vitamina E (mg)	8,32	0,80	8
Vitamina K (µg)	174,10	50,42	65
Ácido pantoténico (mg)	5,32	0,33	5
Biotina (µg)	27,9	3,00	30
Calcio (mg)	953,2	77,57	1200
Hierro (mg)	12,05	0,97	15
Iodo (µg)	127,25	14,38	150
Magnesio (mg)	293,6	21,39	350
Zinc (mg)	9,87	0,65	12
Sodio (mg)	3324,73	597,00	1500
Potasio (mg)	3018,93	267,96	4700
Fósforo (mg)	1496,33	101,53	700
Selenio (µg)	122,67	10,39	55
Cobre (mg)	1,23	0,10	0,9
Cromo (µg)	40,87	5,69	25
Cloro (mg)	2708,87	232,31	2300
Flúor (µg)	215,87	19,15	3000

En cuanto a los micronutrientes (Tabla 4) consumidos, diariamente, destaca el consumo de las vitaminas: B1, niacina, B12, C y K ya que lo consumido (1,39±0,13 mg; 38,19±2,19 mg; 4,97±0,55 µg; 102,42±13,79 mg; 174,10±50,42 µg), fue más del doble de lo recomendado (0,1 mg; 15 mg; 2, µg; 60 mg; 65 µg). Igual para el caso de los minerales: sodio, cobre, cloro, fosforo y selenio (3324,73±597 mg; 1,23±0,10 mg; 2708,87±232,31 mg; 1496,33±101,53 mg; 122,67±10,39 µg) que también fueron superiores a las CDR (1500 mg; 0,9 mg; 2.300 mg; 700 mg; 55 µg), incidir que dobles para los casos de: sodio, fosforo y selenio. Así respecto al consumo diario deficiente, destacaron de mayor a menor importancia, respectivamente: flúor, vitamina D, ácido fólico, potasio, calcio, magnesio, iodo, hierro y zinc (215,87±19,15 µg; 1,91±0,33 µg; 243,27±30,77 µg; 3018,93±267,96 mg; 953,2±77,57 mg; 293,6±21,39 mg; 127,25±14,38 µg; 12,05±0,97 mg; 9,87±0,65 mg) cuyas cantidades consumidas no llegaron a las CDR (3000 µg; 5 µg; 400 µg; 4700 mg; 1200 mg; 350 mg; 150 µg; 15 mg; 12mg).

Discusión

En trabajos anteriores se comprobó que la antigüedad del turno rotativo se correlaciona positivamente con el porcentaje de grasa corporal ($r=0,454$ $p<0,05$), y negativamente con la masa libre de grasa ($r=-0,454$ $p<0,05$) sugiriendo algún efecto negativo de la restricción del sueño por día, en la composición corporal de los individuos⁸.

En nuestro trabajo hemos podido comparar cómo las personas sometidas a turnos de trabajo rotatorio ingieren mayor cantidad de calorías que las necesarias, mayor cantidad de proteínas y mayor cantidad de lípidos. Sin embargo ingieren menor cantidad de hidratos de carbono. Esto es debido a que la restricción de sueño provoca la desregulación del apetito²⁸, lo cual conlleva cambios hormonales que son: disminución de los niveles de leptina, hormona que actúa inhibiendo el apetito a nivel hipotalámico, y por el aumento de los niveles ghrelina, cuya función es estimular ciertas neuronas hipotalámicas que ocasionan aumento del apetito^{9,29}. Los hábitos alimentarios de los trabajadores nocturnos sufren alteraciones en la calidad, cantidad y ritmo de las comidas (mayor consumo de bocadillos, bebidas gaseosas y alcohólicas, snacks, dulces y cafeína), como puede observarse en las Figuras 1, 2 y 7 donde se encuentran las gominolas, los snacks y las bebidas. Todo esto está unido a un mayor consumo de nicotina y estimulantes para combatir el sueño. El número de publicaciones que hemos encontrado es escaso, pero en todos ellos se habla de un incremento de la ingesta total de energía que podría llevar al sobrepeso. El horario habitual de las comidas se modifica, son más rápidas, frías e incluso se prescinde de alguna toma. Las alteraciones digestivas más frecuentes son: dispepsia, gastritis, digestiones pesadas, flatulencia, úlcera de estómago, y aumento de peso debido al consumo excesivo de lípidos cuando el ritmo metabólico es más bajo^{12,30,31}.

Además de los resultados obtenidos se desprende que la dieta no es balanceada ya que el porcentaje idóneo de 50% hidratos de carbono, 35% lípidos y 15% proteínas difiere mucho del consumo real de las voluntarias, constatado en una disminución de las raciones de del grupo 1 (Cereales, patatas, azúcar) y un aumento de las raciones de los grupos 2 (Lípidos, mantequillas, aceites y grasas en general), 3 (Lácteos) y 4 (Cárnicos, huevos y pescados). Recomendado por tanto el aumento de raciones del Grupo 1 en decremento de las raciones de los grupos 2, 3 y 4.

En cuanto a los macro y micronutrientes destacar que el consumo de las vitaminas; vitamina C, vitamina K, niacina y vitamina B12, así como el de las sales minerales; cobre, fósforo, cloro y sodio que fue igual o superior al doble de lo recomendado, alterando el balance hídrico, principalmente el sodio como electrolito, causando hipertensión arterial (HTA). En cuanto a las deficiencias más destacadas, de la dieta diaria, indicar la de los hidratos de carbono. Y respecto a los micronutrientes, priori-

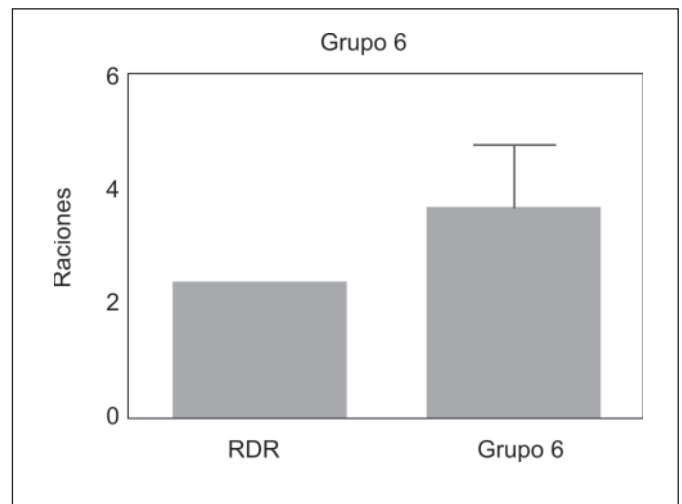


Figura 6. RDR del Grupo 6 (Frutas) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

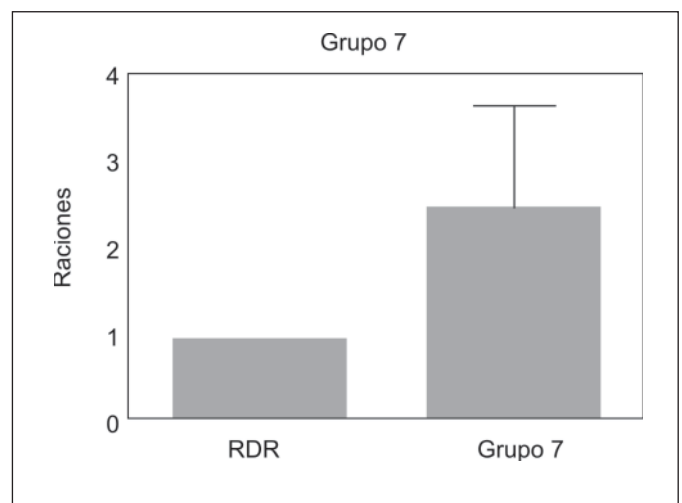


Figura 7. RDR del Grupo 1 (Bebidas) frente a las raciones consumidas de dicho grupo por nuestra población a estudio (N=15)

ariamente las de: flúor, ácido fólico, potasio, yodo, hierro, zinc y magnesio, pero especialmente las de la vitamina D y calcio, siendo su consumo menor del CDR, un factor de riesgo para la osteoporosis.

Podemos concluir afirmando que nuestra población de profesionales sanitarias sometidas a turnos rotatorios, mantuvo una dieta no equilibrada, la cual debería balancearse hacia los hidratos de carbono. Además, principalmente, de corregir el consumo diario, deficiente en calcio y excesivo en sodio, factores de riesgo para la osteoporosis e HTA respectivamente.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración a las voluntarias del *Complejo Hospitalario del Hospital Universitario Infanta Cristina*.

Esta investigación ha sido financiada a través del Plan I.D.T.I de la UEx, 2010 Acción VII. Proyectos de Iniciación a la Investigación y el Desarrollo Tecnológico; *Consejería de Salud y Política Social, Junta de Extremadura; Vicerrectorado de Investigación, Innovación e Infraestructura Científica, Universidad de Extremadura; junto al Centro de Información Cerveza y Salud (CICS)*.

Bibliografía

- Minguez JM. Ritmos biológicos y melatonina. Disponible en URL: [http://www.slideshare.net/jmminguez/1-ritmos-biologicos] [accedido 2011 Noviembre 20].
- Madrid JA, Sánchez Vázquez FJ, Rol MA. Análisis del ritmo circadiano de sueño-vigilia, frecuencia cardiaca, presión arterial, flujo respiratorio máximo, temperatura corporal, fuerza muscular y velocidad de reacción. Prácticas de cronobiología. Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. [Curso2002-03]. Disponible en URL: [http://www.um.es/cronobio/] (accedido 2011 Noviembre 23).
- González N. El horario de verano un factor de producción de ansiedad. Disponible en URL: [http://www.monografias.com/trabajos11/ansi/ansi.shtml] [accedido 2011 Noviembre 18].
- Kozier B, Erb G, Berman A, Snyder S. Fundamentos de enfermería: conceptos, proceso y práctica. Madrid: McGraw – Hill; 2005.
- Kivimaki M, Virtanen M, Elovainio M, Vaananen A, Keltikangas-Jarvinen L, Vahtera J. Prevalent cardiovascular disease, risk factors and selection out of shift work. *Scand J Work Environ Health*. 2006;32:204-8.
- Aranceta-Bartrina J. Nuevos retos de la nutrición comunitaria. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2010;16(1):51-55.
- Cubero J, Cañada F, Costillo E, Franco L, Calderón M, Santos AL, Padez C, et al. The pre-school feeding, health education from 2 to 6 years. *Enfermería Global*. (Aceptado en noviembre de 2011).
- Ruiz de la F M, Cifuentes M MT, Segura B O, Chavarria S P, Sanhueza R X. Estado nutricional de trabajadores bajo turnos rotativos o permanentes. *Rev Chil Nutr* 2010; 37(4): 446-454.
- Copinschi G. Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essent Psychopharmacol*. 2005;6(6):341-7.
- Stamatakis KA, Brownson RC. Sleep duration and obesity-related risk factors in the rural Midwest. *Prev Med*. 2008;46(5):439-44.
- Wolk R, Gami AS, Garcia-Touchard A, Somers VK Sleep and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30(12):625-62.
- Fernández Rodríguez MJ, Bautista Castaño I, Bello Luján L, Hernández Bethencourt L, Sánchez Villegas A, Serra L. Valoración nutricional de trabajadores sanitarios expuestos a turnicidad en Canarias. *Nutr. Hosp*. 2004;19 (5): 286-291.
- Lopez Simões MR, Marques FC, de Mattia Rocha A. El trabajo en turnos alternados y sus efectos en lo cotidiano del trabajador que beneficia granos. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 2010 nov-dic. 18(6):[07 pantallas].
- Gutiérrez Fuentes JA. Síndrome polimetabólico. Experiencia del estudio DRECE. *Rev Esp Cardiol*. 1995;48 Supl:18-27.
- Hubert HB, Feinlib M, McNamara PM, Castelly WP. Obesity as independent risk factor for cardiovascular disease. A 26 follow-up of participants in Framingham Study. *Circulation*. 1983;67:966-77.
- Grundey SM, Greenland P, Herd A, Huebsch JA, Jones RJ, Mitchell JH, et al. Cardiovascular and risk factor evaluation of healthy american adults. *Circulation* 1987;75:1340-6.
- Ros Rahola E, Fisac C, Pérez-Heras A. ¿Qué es realmente la dieta mediterránea? *FMC*. 1998;5:557-71.
- Nestle M. Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr* 1995;61(Suppl):S1313-20.
- Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev* 1997;55:383-9.
- Sánchez CL, Franco L, Bravo R, Rubio C, Rodríguez AB, Barriga C, Cubero J. Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2010;16(3):160-163.
- Moreiras-Varela O. The Mediterranean diet in Spain. *Eur J Clin Nutr* 1989;43(Suppl 2):83-7.
- Álvarez-Sala LA, Millán J, De Oya M. La dieta mediterránea en España. ¿Leyenda o realidad? (II). Otros elementos de la dieta mediterránea: verdura y fruta, el pescado. Evolución de la dieta y de las enfermedades cardiovasculares en España en las últimas décadas. *Rev Clin Esp*. 1996;196:636-46.
- Sánchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, Gonzalez R, Rivero M, Barriga C, y Cubero J. *Arch Latinoam Nutr*. 2008 Vol.58 nº4.
- Pascua IC, Moreno CR. The nutritional status and eating habits of shift workers: a chronobiological approach. *Chronol Int*. 2004;21(6):949-60.
- Mataix JM, Mañas M, Tablas de composición de alimentos españoles. 3ª ed. Granada; Monográfica; 2008.
- AESAN Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española.
- Dapcich V, Salvador Castell G, Ribas Barba L, Pérez Rodrigo C, Aranceta Bartrina J, Serra Majem L. Guía de alimentación saludable. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Barcelona (España) 2004.
- Knutson K, Spiegel K, Penev P, Cauter EV. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev*. 2007;11(3):163-178.
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med*. 2004;1(3):e62.
- García López A. Enfermería y turno de noche: trabajar contra corriente. *Inferm Ponent*. 2003;8:1-7.
- Bonet-Porqueras R, Moliné Pallarés A, Olona Cabases M, Gil Mateu E, Bonet Notario P, Les Morell E, Iza-Maizaf M. et al. Turno nocturno: un factor de riesgo en la salud y calidad de vida del personal de enfermería. *Enferm Clin*. 2009;19:76-82.

2.1.3. Capacidad Antioxidante en orina

2.1.3. Antioxidant capacity in urine

Cell Membranes and Free Radical Research

Volume 4, Number 1, October 2013

ISSN Numbers: 1308-4178 (On-line), 1308-416X

Indexing: Google Scholar, Index Copernicus, Chemical Abstracts, Scopus (Elsevier),
EBSCOhost Research Database

EDITOR

Editor in Chief

Mustafa Nazıroğlu, Department of Biophysics,
Medical Faculty, Suleyman Demirel University, Isparta,
Turkey.

Phone: +90 246 211 37 08. Fax: +90 246 237 11 65

E-mail: mustafanaziroglu@sdu.edu.tr

Managing Editor

A. Cihangir Uğuz, Department of Biophysics, Medical
Faculty, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey.

E-mail: biophysics@sdu.edu.tr

EDITORIAL BOARD

Cell Membranes, Ion Channels and Calcium Signaling

Alexei Tepikin, The Physiological Laboratory, University of
Liverpool, Liverpool, UK

Andreas Lückhoff, Institute of Physiology, Medical Faculty,
RWTH-Aachen University, Germany

Andreas Daiber, 2nd Medical Clinic, Molecular Cardiology,
Medical Center of the Johannes Gutenberg University,
Mainz, Germany

Giorgio Aicardi, Department of Human and General
Physiology, University of Bologna, Italy.

Gemma A. Figtree, North Shore Heart Research Group
Kolling Institute of Medical Research University of Sydney
and Royal North Shore Hospital
Sydney, AUSTRALIA.

Jose Antonio Pariente, Department of Physiology,
University of Extremadura, Badajoz, Spain.

James W. Putney, Jr. Laboratory of Signal Transduction,
NIEHS, NC, USA.

Martyn Mahaut Smith, Department of Cell Physiology and
Pharmacology, University of Leicester, Leicester, UK.

Stephan M. Huber, Department of Radiation Oncology,
Eberhard - Karls University Tübingen, Germany

Enzymatic Antioxidants

Michael Davies, Deputy Director, The Heart Research
Institute, Sydney, Australia.

Süleyman Kaplan, Department of Histology and
Embryology, Medical Faculty, Samsun, Turkey

Xingen G. Lei, Molecular Nutrition, Department of Animal
Science, Cornell University, Ithaca, NY, USA

Ozcan Erel, Department of Biochemistry, Medical Faculty,
Yıldırım Beyazıt University.

Nonenzymatic Antioxidants, Nutrition and Melatonin

Ana B. Rodriguez Moratinos, Department of Physiology,
University of Extremadura, Badajoz, Spain.

Cem Ekmekcioglu, Department of Physiology, Faculty of
Medical University of Vienna, Austria.

Peter J. Butterworth, Nutritional Sciences Division, King's
College London, London, UK

AIM AND SCOPE

Cell Membranes and Free Radical Research is a print and
online journal that publishes original research articles,
reviews and short reviews on the molecular basis of
biophysical, physiological and pharmacological processes
that regulate cellular function, and the control or
alteration of these processes by the action of receptors,
neurotransmitters, second messengers, cation, anions,
drugs or disease.

Areas of particular interest are four topics. They are;

A- Ion Channels (Na⁺ - K⁺ Channels, Cl⁻ channels, Ca²⁺
channels, ADP-Ribose and metabolism of NAD⁺, Patch-
Clamp applications)

B- Oxidative Stress (Antioxidant vitamins, antioxidant
enzymes, metabolism of nitric oxide, oxidative stress,
biophysics, biochemistry and physiology of free oxygen
radicals)

C- Interaction Between Oxidative Stress and Ion Channels

(Effects of the oxidative stress on the activation of the
voltage sensitive cation channels, effect of ADP-Ribose
and NAD⁺ on activation of the cation channels which
are sensitive to voltage, effect of the oxidative stress on
activation of the TRP channels)

D- Gene and Oxidative Stress (Gene abnormalities.
Interaction between gene and free radicals. Gene
anomalies and iron. Role of radiation and cancer on
gene polymorphism)

READERSHIP

Biophysics
Biochemistry
Biology
Biomedical Engineering
Pharmacology
Physiology
Genetics
Cardiology
Neurology
Oncology
Psychiatry
Neuroscience

Keywords

Ion channels, cell biochemistry, biophysics, calcium
signaling, cellular function, cellular physiology,
metabolism, apoptosis, lipid peroxidation, nitric oxide
synthase, ageing, antioxidants, neuropathy.

Effects of beer, Hops (*Humulus lupulus*) on total antioxidant capacity in URINE of stressed subjects

Lourdes Franco¹, Rafael Bravo¹, Carmen Galan¹, Cristina Sanchez¹, Ana Beatriz Rodriguez¹, Carmen Barrigs¹, Javier Cubero^{1,2}.

¹ Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, Department of Physiology. University of Extremadura, Badajoz, Spain

² Laboratory of Health Education, Experimental Sciences Education Area. University of Extremadura, Badajoz, Spain.

List of abbreviations

Corresponding Address

Javier Cubero Juárez
Laboratory of Health Education
Area of Experimental Sciences Education
University of Extremadura
Av. Elvas s/n 06006 Badajoz, SPAIN
Phone & Fax: +34 924 286576
E-mail: jcubero@unex.es

Acknowledgments

This research has been supported by Gobierno de Extremadura, (Fondos FEDER), PII-Acción VII-UEx and Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

Abstract

The fermented drinks of low graduation like beer has many healthy properties such as low-calories, protein compounds, minerals and trace elements, vitamins A, D and E, carbon dioxide and polyphenols. Beer is the only drink which contains Hops (*Humulus lupulus*) and this plant produces a greater and better antioxidant effect. The objective of our experiment was measured the *Antioxidant Capacity* after consumed a non-alcoholic beer. The trial was conducted in a stressed population of 17 female healthy volunteers who drank beer in dinner during two weeks. We analyzed the *Antioxidant Capacity* in urine. The results showed that the consumption of non-alcoholic beer at dinner increases the *Antioxidant Capacity*. In conclusion, our assayed population which ingested a non-alcoholic beer increased the antioxidant levels.

Keywords

Antioxidant, hops, beer, resveratrol and xanthohumol.

Introduction

The source for the majority of life is photosynthesis which turns sun energy into redox energy (Demmig-Adams, 2002). Plants have high concentration of active antioxidants which work like a secondary metabolite, for example, alcohols and polyphenols like xanthohumol and resveratrol, and also carotenoids, glutation, ascorbic acid, antioxidant enzymes, which help to prevent dangerous damage as oxidative stress to cell components (Demmig-Adams, 2002; Benzie, 2003; and Pinto, 2012).

Beer is a fermented drink has many nutritional properties, and contains polyphenols and low levels of graduation (0.1-5%) of alcohol, which generate in moderate consumption an effect healthy (Sánchez, 2010; Arranz, 2012). Beer is the only drink that contains Hops (*Humulus lupulus*) which give the typical bitter flavor. The polyphenols from the hops and the beer: xanthohumol and resveratrol generate in this beverage the antioxidant properties and may reach 0,148 mmol/100 g depending on the type of beer (Bente, 2011).

Flavonoids are a group of natural substances found in the plant kingdom. Have discovered more than 4000 different species of flavonoids, found in fruits, vegetables, seeds, stems, flowers, thus being constituents important in the human diet. His basic structure is: 2 rings benzenes bonded through a ring pyrone (Bravo, 1998). The chemical structure of the phenolic compounds, is conferred by their ability to act as free radical scavengers (Heim, 2002). Beer contains a significant amount of flavonoids. Researchers from King's College London have published an investigation into the presence of flavonoids in various types of beverages and potential role as an antioxidant ferulic acid is found in low alcohol beers (Bourne, 2000). In another study of Oregon State University has shown that hops flavonoids dependent monooxygenases can inhibit cytochrome P-450, suggesting a potential role in modulating the activation of carcinogens (Henderson, 2000). The same group of researchers has confirmed that chalcones and flavanones are inducers of quinone reductase and may have a preventive role in the progression of hepatomas (Miranda, 2000).

Xanthohumol is one of the major flavonoids present in beer from Hops. This biomolecule is used to preserve beer as well as to give the characteristic aroma and flavor to beer (Pinto, 2012). The mechanism of action of xanthohumol has not yet been fully elucidated. Although the evidence for the beneficial effect of xanthohumol is promising, most studies were carried out in vitro. Recently, it has been reported that supplementing the drinking water of rats with xanthohumol prevents

against heterocyclic aromatic mutagens which induce preneoplastic lesions and DNA damage in the liver and colon (Ferk, 2010).

Resveratrol (3, 4, 5-trihydroxy-trans-stilbene) has been found in some hop varieties (Chiva-Blanch, 2010). It is a natural nonflavonoid polyphenolic found in the skin of red grapes (Shakibaei, 2009). Its antioxidant capacity is based in changes in low-density lipoproteins (LDL) properties by oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is believed to play a major role in atherosclerosis. The oxidation affects the protein moiety (Apo B) of LDL particles impairing their catabolism by the regulated apo B/E receptor system. Therefore, the protective role of foods rich in phenolic compounds has been attributed to their antioxidant properties (Rice-Evans, 1997) were the first to demonstrate that trans-resveratrol added to human LDL, reduced the copper-catalyzed oxidation (Frankel 1993). Other benefits of resveratrol are the prevention of the inflammation and cellular senescence (Chung, 2012).

For all these scientific arguments the objective of our experiment was measured the *Antioxidant Capacity* after consumed a non-alcoholic beer, in a stressed population.

Materials and methods

Subjects

The trial was conducted in a population of 17 female volunteers (auxiliary, nurses and doctors) belonging to the Extremadura Health Service (SES) Badajoz (Spain), which work in rotating shifts and / or night shift, and with an elevated level of work stress and / or mood (assessed by a questionnaire of stress). These women were healthy (40.9±10.5 years), with normal weight and not under any prescription that might influence the study objectives. This project was approved by the Ethics Committee of the University of Extremadura.

Antioxidant Analysis

We chose a longitudinal intervention design in which each subject was his own control. The experimental period was 3 weeks, being the first 7 days the (Week Control), in which the individuals did not ingest any beer at dinner, until the second week (Week 1), in which the individuals ingested 330 mL of non-alcoholic beer during dinner, and the third week (Week 2) is the second week that consumed beer. Urine samples were collected at the end of each of the three weeks of the study. The *Antioxidant Capacity* was analyzed by the improved spectrophotometric "TEAC" method (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (Cubero, 2009). This analysis allows us to calculate the

percent inhibition of ABTS+ radical cation by Trolox, a water soluble analogue of alpha-tocopherol (vitamin E), which is used as a standard antioxidant. The analysis was carried out on a TECAN plate reader M200 (Männedorf / Switzerland). The wavelength for the study was 730 nm.

Statistical Analysis

After confirming that the population belonged to the Normal, the results were analyzed by *t-Student* test for comparisons between the two groups. We used software GraphPad Prism 5.

Results

Results obtained in a population with high levels of stress (Table 1), showed that the consumption of non-alcoholic beer at dinner increases the antioxidant levels (0.02 mg Trolox) measured in urine.

We observed a growing of *Antioxidant Capacity* in Treatment Group after drinking a non-alcoholic beer for two weeks (0.15±0.03 mg Trolox), versus the Control group without drinking a beer at dinner (0.13±0.01 mg Trolox, Figure 1).

Discussion

It is demonstrated that of free radicals with drinking non-alcoholic beer at dinner is very important for people who work at night because in those hours of sleep, our system acts against free radicals produced in our diurnal life, in addition to fighting viruses and bacteria. Besides, the components of beer are very important of treated oxidative damage, for example, Hops have been used to treat a variety of pathological processes including rheumatism, inflammation and climacteric complaints (Zanoli, 2008). Thus the polyphenol xanthohumol prevents the acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats (Pinto, 2012); respecting to polyphenols many of the biological effects of them have been attributed to their antioxidant properties, either through their reducing capacities per se or through their possible influences on intracellular redox status (Angeloni, 2012).

Table 1. Demographic values of the stressed population (n=17).

Parameters	Mean X±SD
Age (years)	40.90±10.50
Weight (kg)	62.40±11.50
Height (m)	1.61±0.07
CMI (kg/m ²)	24.40±5.30

We report that treatment with non-alcoholic beer shows antioxidant effect of Hops. Our data suggest that the protective properties of non-alcoholic beer are based on the antioxidant effect of the components of Hops: resveratrol and xanthohumol. Our *in vivo* results agree with previous *in vivo* studies (Pinto 2012) and *in vitro* studies reporting the efficiency of polyphenols (Rodriguez 2001).

There were found similar results with the non-alcoholic beer and this *antioxidant ability* (Gonzalez, 2001), by Garrido, (2010) and Bravo, (2012) using cherries and cereals enriched in tryptophan respectively which were supplied to people in dinner.

Referent our trail in stressed population, this *Antioxidant Capacity* will be more higher with higher doses (660 ml) and more time (30 days) of ingest of non alcoholic beer showing the indications of the investigations by Codoñer-Franch, 2012 and Arnao, 2001. For this reason we recommend to increase the ingestion the nonalcoholic beer with this higher dose and more duration.

Apart from that polyphenols show antimicrobial activity, being primarily responsible for the presence of gallic acid. This acid is a natural defense mechanism in many fruits against the development of microbial and fungal diseases (Chung, 1993).

Finally, highlight that the bitter acids components of the Hops modulate on the amino acid GABA (main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system), at the same time as myrcenol a terpenoid and xanthohumol in beer from Hops improve its sedative properties (Franco, 2012a and Franco, 2012b).

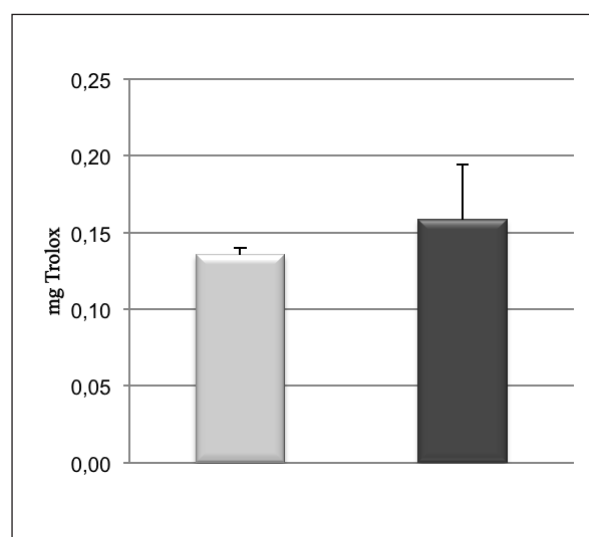


Figure 1. Comparison of *Antioxidant Capacity* (mg of Trolox) between the Control Group and Group of two weeks of Treatment with non-alcoholic beer.

Conclusion

Drinking a non-alcoholic beer could increase *Antioxidant Capacity* which was measured in the urine from stressed population.

Acknowledgments

This research has been supported by Government of Extremadura Spain, (FEDER), PII-Acción VII-UEx and *Centro de Información Cerveza y Salud* (CICS) Spain.

References

1. Angeloni C, Pirola L, Vauzour D, Maraldi T. 2012. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation.
2. Arnao MB, Cano A, Alcolea JF, Acosta M. 2001. Stimulation of free radical-quenching activity of leaf pigment extract. *Phytochem Anal* 12:138-143.
3. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM and Estruch R. 2012. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients* 4:759-781.
4. Halvorsen B, Carlsen M, Phillips K, Bøhn S, Holte K, Jacobs D, Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr*. 84:95-135.
5. Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol* 2003, 136:113-26.
6. Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice-Evans C. 2000. Absorption of ferulic acid from low alcohol beer. *Free Radical Research* 32: 273-280.
7. Bravo L. 1996. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.
8. Bravo R, Matito S, Cubero J, Paredes SD, Franco L, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C. 2012. Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans. *AGE* 7(7):e37290
9. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Rotchés-Ribalta M, Zamora-Ros R, Llorach R, Lamuela-Raventós R, Estruch R, Andrés-Lacueva C. 2011. Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J of Chromat A* 1218: 698-705.
10. Chung KT; Stevens SE. *Environ. Toxicol. Chem.* 1993, 12: 2121-2132.
11. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW. 2012. Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols *Arch. Biochem. Biophys.* 501: 79-90.
12. Codoñer-Franch P, Hernández-Aguilar MT, Navarro-Ruiz A, López-Jaén AB, Borja-Herrero C, Valls-Bellés V. 2012. Diet Supplementation During Early Lactation with Non-alcoholic Beer Increases the Antioxidant Properties of Breastmilk and Decreases the Oxidative Damage in Breastfeeding Mothers. *Breastfeed Med.*
13. Cubero J, Sánchez CL, Bravo R, Sánchez J, Rodríguez AB, Rivero M, Barriga C. 2009. Analysis of the Antioxidant Activity in Human Milk, day vs. Night. *Cell Membranes and free radical research*. 3:100-101.
14. Demmig-Adams B, Adams W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*. 298:2149 -2153.
15. Ferk F, Huber WW, Filipic M, Bichler J, Haslinger E, Misik M, Nersesyan A, Grasl-Kraupp B, Zegura B, Knasmüller S. 2010. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f] quinoline (IQ). *Mutat. Res.* 691: 17-22.
16. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez AB, Barriga C, Romero E, Cubero J. 2012 b. The sedative effects of non-alcoholic beer in healthy female nurses. *PLoS* 7: e37290.
17. Franco L, Sánchez CL, Bravo R, Barriga C, Cubero J. 2012. The sedative effects of hops (a component of beer), on activity/rest rhythms. *Acta Physiol Hung.* 20:32-28.
18. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol *Lancet*. 341: 1103-1104.
19. Garrido M, Paredes SD, Cubero J, Lozano M, Toribio-Delgado AF, Muñoz JL, Reiter R, Barriga C, Rodríguez AB. 2010. Jerte Valley Cherry-Enriched Diets Improve Nocturnal Rest and Increase 6-Sulfatoxymelatonin and Total Antioxidant Capacity in the Urine of Middle-Aged and Elderly Humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65:909-914.
20. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.
21. Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. 2000. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops. *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* 30: 235-251.
22. Miranda CL, Aponso GL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. 2000. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductases in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letts* 149: 21-29.
23. Pinto C, Duque AL, Rodríguez-Galdón B, Cestero JJ, Macías P. 2012. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 50:3405-3412.
24. Rice-Evans CA, Miller J, Paganga G. 1997. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
25. Rodriguez RJ, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on the liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rats hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 39:437-445.
26. Shakibaei KB, Harikumar BB. 2009. Aggarwal Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* 53: 115-128
27. Zanolli P, Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol* 116: 383-396.

2.2. En Estudiantes Universitarios (UEx) sometidos al estrés de exámenes finales en los que se analizaron:

2.2.1. Parámetros del sueño nocturno mediante Activimetría y ansiedad.

2.2. In University Students (UEx) under the stress of final exams where we analyze:

2.2.1. Nocturnal sleep parameters through Activimetry and anxiety.

Análisis de la mejora de la calidad del sueño y la ansiedad en estudiantes universitarios, bajo estrés, mediante el consumo de cerveza sin alcohol

Lourdes Franco Hernández¹, Rafael Bravo Santos¹, Carmen Galán de Isla¹, Ana Beatriz Rodríguez Moratinos¹, Carmen Barriga Ibars¹, Javier Cubero Juárez²

¹Grupo de Investigación: Neuroinmunofisiología y Crononutrición. Dpto. de Fisiología.

²Laboratorio de Educación para la Salud. Área de Dca. de Ciencias Experimentales. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

Recibido: 31.07.2012
Aceptado: 29.10.2012

Palabras clave:
Cerveza. Sueño.
Ansiedad. Estudiantes.

Resumen

Fundamentos: La cerveza sin alcohol es una bebida saludable. Esta contiene lúpulo que junto a sus polifenoles: myrcenol y xanthumol aportan a la cerveza propiedades sedantes. Nuestro objetivo es determinar la influencia de la cerveza sin alcohol sobre la ansiedad y la calidad del sueño nocturno, en una población de estudiantes sometidos a estrés.

Métodos: Se reclutó una población de 31 estudiantes. Se les analizó el sueño mediante Activimetría por Actiwatch®, durante 3 semanas. Y se les realizaron el *Cuestionario de sueño Pittsburgh* y *Cuestionario de ansiedad STAI*. Las 2 últimas semanas se ingirió una cerveza sin alcohol en la cena.

Resultados: En Activimetría se mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la disminución de la Latencia de sueño tras la ingesta de cerveza sin alcohol ($16,67 \pm 17,62$ min), frente al grupo control ($22,19 \pm 21,34$ min). También se observaron diferencias en el *Cuestionario de sueño Pittsburgh*, siendo estadísticamente significativas en la segunda semana de tratamiento ($7,07 \pm 4,37$) frente a la Semana Control ($9,03 \pm 6,31$). Además del *Cuestionario de Ansiedad/Estado STAI*, que mostró disminución.

Conclusión: La Latencia de sueño analizada por Activimetría mejora tras la toma de una cerveza sin alcohol en la cena. El *Índice de sueño de Pittsburgh* constata dicha mejoría en el sueño nocturno. Así como la disminución de la *Ansiedad/Estado por STAI*.

Analysis of improved sleep quality and anxiety in college students under stress by consuming non-alcoholic beer

Summary

Introduction: Non-alcoholic beer it is a healthy beverage. Its contains hop, and polyphenols: myrcenol and xanthoumol giving beer sedative properties. Our aim is to determine the influence of non-alcoholic beer on anxiety and sleep quality in a student population under stress.

Methods: A population of 31 students. Sleep data were collected through Actimetry (Actiwatch®) for 3 weeks. Participants filled out the *Pittsburgh Sleep Questionnaire* and *STAI Anxiety Questionnaire*. Last 2 weeks volunteers ingested a non-alcoholic beer at dinner.

Results: Results showed significant differences ($p < 0.05$) of reduction in Sleep latency after ingesting non-alcoholic beer (16.67 ± 17.62 min) versus the control group (22.19 ± 21.34 min). Statistically significant differences were showed in the *Pittsburgh Sleep Questionnaire* in the second week of treatment (7.07 ± 4.37) compared to the Control week (9.03 ± 6.31). Regarding the *STAI Anxiety Questionnaire*, it was observed a decrease.

Conclusion: There is a decrease in Sleep latency after ingesting non-alcoholic beer at dinner. *The Pittsburgh Sleep Index* found that improvement in nighttime sleep. And the *Anxiety/State by the STAI* improves.

Key words:
Beer. Sleep.
Anxiety. Students.

Correspondencia: Lourdes Franco
E-mail: lourdesfh@unex.es

Introducción

La cerveza, está compuesta por distintos componentes que confieren a esta bebida fermentada distintas propiedades beneficiosas para la salud¹. Entre estos componentes se encuentran los ácidos alfa del lúpulo (*Humulus lupulus*), y sus polifenoles: myrcenol y el xanthumol, todos ellos modulan la actividad de los receptores del neurotransmisor GABAA, haciendo que esta bebida fermentada, cuando posee una concentración menor al 1% en alcohol, presente propiedades hipnóticas contrastadas²⁻⁶. Aunque existe una gran variedad de niveles para un "consumo moderado de alcohol", cabe indicar que el alcohol no afecta a toda la población por igual, pues depende principalmente del Índice de Masa Corporal (IMC) de cada individuo. El Centro de Información Cerveza y Salud (CICyS), se refiere a la ingesta moderada como aquella de aproximadamente 10 g de alcohol diarios, lo que equivale a unos 200 mL de cerveza (1 caña), con un contenido alcohólico de entre 4-5°. En numerosos trabajos científicos^{7,8}, como "consumo moderado de alcohol" se recomienda 330 mL/día (1 tercio) para mujeres y 660 mL/día (2 tercios) en el caso de los hombres. Finalmente, la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA), recomienda el consumo de 2 unidades al día (una unidad equivale a 10 g de etanol). Por todo lo expuesto, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC)², incluye en la Pirámide de la Alimentación Saludable –principal referencia en materia nutricional de nuestro país– las bebidas fermentadas (cerveza, vino o sidra) de forma opcional y moderada.

Por otro lado, todos los seres vivos disponen de un sistema capaz de medir el tiempo, es decir, un reloj biológico que controla sus funciones, tanto en lo que se refiere a variables bioquímicas, fisiológicas, como de conducta. La ritmicidad es, de este modo, una de las propiedades fundamentales de los seres vivos^{7,9}. Uno de los ritmos más importantes es ritmo circadiano sueño/vigilia. El sueño es una necesidad humana básica, es un proceso universal común a todas las personas. El sueño se considera como un estado de alteración de la conciencia en el que la percepción y la reacción al ambiente del paciente están disminuidas. El sueño se caracteriza por una actividad física mínima, niveles variables de conciencia, cambios en los procesos fisiológicos orgánicos y disminución de la respuesta ante estímulos externos¹⁰. El deterioro de la salud física se manifiesta, en primer lugar, por alteración de los hábitos, trastornos del sueño y alimentarios, y más a largo plazo, por alteraciones cardiovasculares y neuropsíquicas¹¹.

Las alteraciones neuropsíquicas, como la ansiedad, vienen desencadenadas por un estrés como es el de los exámenes, es decir, la ansiedad es la respuesta psicológica al estrés. La ansiedad académica puede estar relacionada con la presencia de depresión en los estudiantes universitarios. Se puede experimentar una imposibilidad de actuar, tomar decisiones, expresarse uno mismo o manejar situaciones cotidianas. Como consecuencia, se puede tener dificultad a la hora de leer y entender preguntas, organizar pensamientos o recordar palabras o conceptos¹².

Teniendo en cuenta estas premisas, nos propusimos analizar la posible mejora de la calidad del sueño y la ansiedad en estudiantes universitarios en periodo de exámenes oficiales mediante el consumo, durante la cena, de cerveza sin alcohol.

Método

Población a estudio

Se reclutó una población de 31 (15 mujeres y 16 varones) individuos sanos con normopeso cuyas características antropométricas se encuentran descritas en la Tabla 1. Todos los estudiantes se encontraban bajo el estrés sometido a los exámenes oficiales de la Universidad de Extremadura. Dicho ensayo fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura. Así todos los individuos enrolados aceptaron y firmaron el correspondiente Consentimiento Informado.

Tabla 1. Datos antropométricos de la población estudiada.

Parámetro antropométrico	Media	Desviación Estándar
Edad (años)	23	±2,3
Peso (kg)	64,8	±14,4
Altura (m)	1,70	±0,09
IMC (kg/m ²)	22	±3,3

IMC: índice de masa corporal (n=31); 15 mujeres y 16 varones.

Protocolo

Dado que los sujetos enrolados para participar en nuestra investigación, debían estar bajo condiciones significativas de estrés, el experimento se llevó a cabo en periodo de exámenes universitarios oficiales en la convocatoria de febrero de 2012.

Se eligió un diseño de intervención longitudinal, mediante estudio cruzado en el que cada sujeto fue su propio control. El período experimental fue de 3 semanas, siendo los primeros 7 primeros días los correspondientes al control, sin cerveza (Semana control). Durante los 14 días siguientes, los 7 primeros correspondientes a la "Semana 1" y los 7 restantes a la "Semana 2", los individuos ingirieron cerveza durante la cena, 330 mL de cerveza sin alcohol (*Mahou Laiker Sin*[®]). Durante el tiempo que duró el ensayo los sujetos portaron en la muñeca no dominante un actímetro (*Actiwatch*[®], *Cambridge Neurotechnology*[®]), el cual registra su actividad diaria y nos permite conocer todos los parámetros de sueño necesarios para la consecución del estudio. Los parámetros analizados mediante el software *Sleep Analysis*[®] (*Cambridge Neurotechnology*[®]) fueron los siguientes:

- Tiempo en cama: tiempo permanecido en cama.
- Tiempo real del sueño: determinado por algoritmos, siendo

equivalente a la diferencia entre el 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.
- Actividad total: número total de actividad durante el sueño nocturno.

Además al final de cada semana los voluntarios rellenaron 2 cuestionarios: el *Test de calidad de sueño de Pittsburg*¹³ y el *Cuestionario de ansiedad Estado/Rasgo STAI*¹⁴. Ambos fueron autocompletados al final de cada una de las 3 semanas en las que se llevó a cabo el experimento. El Cuestionario de Pittsburg, mediante los parámetros de calidad subjetiva del sueño, latencia, duración, eficiencia habitual, alteraciones, uso de medicación hipnótica y disfunción diurna obtenemos la calidad subjetiva del sueño. Las preguntas hacen referencia a la última semana. La puntuación de los siete componentes oscila entre 0 (no existe dificultad) y 3 (grave dificultad); la puntuación global tiene un rango entre 0 (ninguna dificultad) y 42 (dificultades en todas las componentes)¹⁵. El otro cuestionario que se analizó fue el *Cuestionario de Ansiedad Estado/Rasgo STAI*. Este cuestionario consta de dos partes, con 20 preguntas cada una de ellas. La primera parte son las preguntas Ansiedad/Estado (A/E), donde se evalúa un estado emocional transitorio, caracterizado por sentimientos subjetivos, conscientemente percibidos, de atención y aprensión y por hiperactividad del sistema nervioso autónomo. La segunda parte, las preguntas Ansiedad/Rasgo (A/R), señalan una propensión ansiosa, relativamente estable, que caracteriza a los individuos con tendencia a percibir las situaciones como amenazadoras. El tiempo de aplicación es de 20 minutos aproximadamente y se separa a la población por sexos. Esclarecer según indican los rigurosos resultados elaborados por Spielberg, que para el Percentil 50 la Ansiedad / Estado en población femenina sana debe de ser 21 y para población masculina sana debe de ser 19¹⁴.

Análisis estadístico

1. Estudio Descriptivo: cálculo de los valores representativos de la media aritmética $\bar{X} \pm$ desviación estándar (DS).
2. Estudio Inferencial: Tras comprobar que por el *Test de Kolmogorov-Smirnov*, la población seguía una distribución normal. Los resultados fueron analizados utilizando la *Prueba de t-Student* para comparaciones de grupos equilibrados dos a dos, tomando como nivel de significación $p < 0,05$.

Para la resolución estadística de los datos obtenidos, se precisó el software *Graphpad Prism*®. v.5.50 para entorno Windows®.

Resultados

Para el estudio de los parámetros de sueño analizados por Activimetría dispusimos de 18 voluntarios (n=18). Todos los

resultados que a continuación se exponen, fueron obtenidos mediante el software *Sleep Analysis*®.

Como se observa en la Figura 1, los parámetros *Tiempo en Cama* (1a), *Sueño Real* (1b), *Eficiencia de Sueño* (1c) y *Actividad Total* (1d) no mostraron cambios significativos. Indicar que el consumo de una cerveza sin alcohol en la cena a lo largo de las 2 semanas nunca produjo descenso en la calidad del sueño nocturno.

Latencia de sueño

En cuanto a la Latencia del sueño, (Figura 2) los resultados obtenidos mostraron que tanto en la primera (18,22±18,12 min), como en la segunda semana de tratamiento (16,67±17,62 min) de la toma de cerveza sin alcohol por la noche, se obtuvo una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en cuanto a este parámetro respecto al grupo control (22,19±21,34 min).

Índice de calidad de sueño de Pittsburgh

Tal y como se observa en la Figura 3, se apreció un sueño de mayor calidad en los alumnos en época de estrés desde la primera semana de tratamiento de la toma de cerveza sin alcohol por la noche.

Esta mejora fue significativamente mejor ($p \leq 0,05$) en la segunda semana (7,07±4,37) de tratamiento respecto al control (9,03±6,31).

Cuestionario Ansiedad Estado-Rasgo

Los resultados obtenidos en hombres se recogen en la Tabla 2. En la misma se indica un descenso en la Ansiedad/Estado (A/E) a lo largo del tratamiento. Estos valores descendieron de 21,06±10,05 en el Control a 18,76±8,44 en la Semana 1 y 16,23±7,09 en la Semana 2. Aclarar que comparando nuestros resultados con los elaborados por Spielberg *et al.*, se observó, fehacientemente, que partíamos de una situación de Ansiedad/Estado (A/E) al obtener

Tabla 2. Análisis de la ansiedad de la población masculina en estudio, que ingirió cerveza sin alcohol (330 ml), durante la cena.

Semanas	Ansiedad/Estado	Ansiedad/Rasgo
Control	21,06±10,05	19,82±6,95
Semana 1	18,76±8,44	19,26±5,73
Semana 2	16,23±7,09	18,82±5,34

Ansiedad ($\bar{X} \pm DE$) de n=16 alumnos varones. Control: semana que ingirieron su dieta habitual. Semana 1: del día 1 al 7 de tratamiento. Semana 2: del día 8 al 14 de tratamiento.

Ansiedad/ Estado para el Percentil 50 en población masculina=21. Spielberg *et al* 2008.

Figura 1. Resultados obtenidos ($\bar{X} \pm DE$) en el Tiempo en Cama (1a), Sueño Real (1b), Eficiencia de Sueño (1c) y Actividad Total (1d) de los alumnos que ingirieron una cerveza sin alcohol en la cena durante las 2 semanas que duró el tratamiento (n=18). Control: semana que ingirieron su dieta habitual. Semana 1: del día 1 al 7 de tratamiento. Semana 2: del día 8 al 14 de tratamiento.

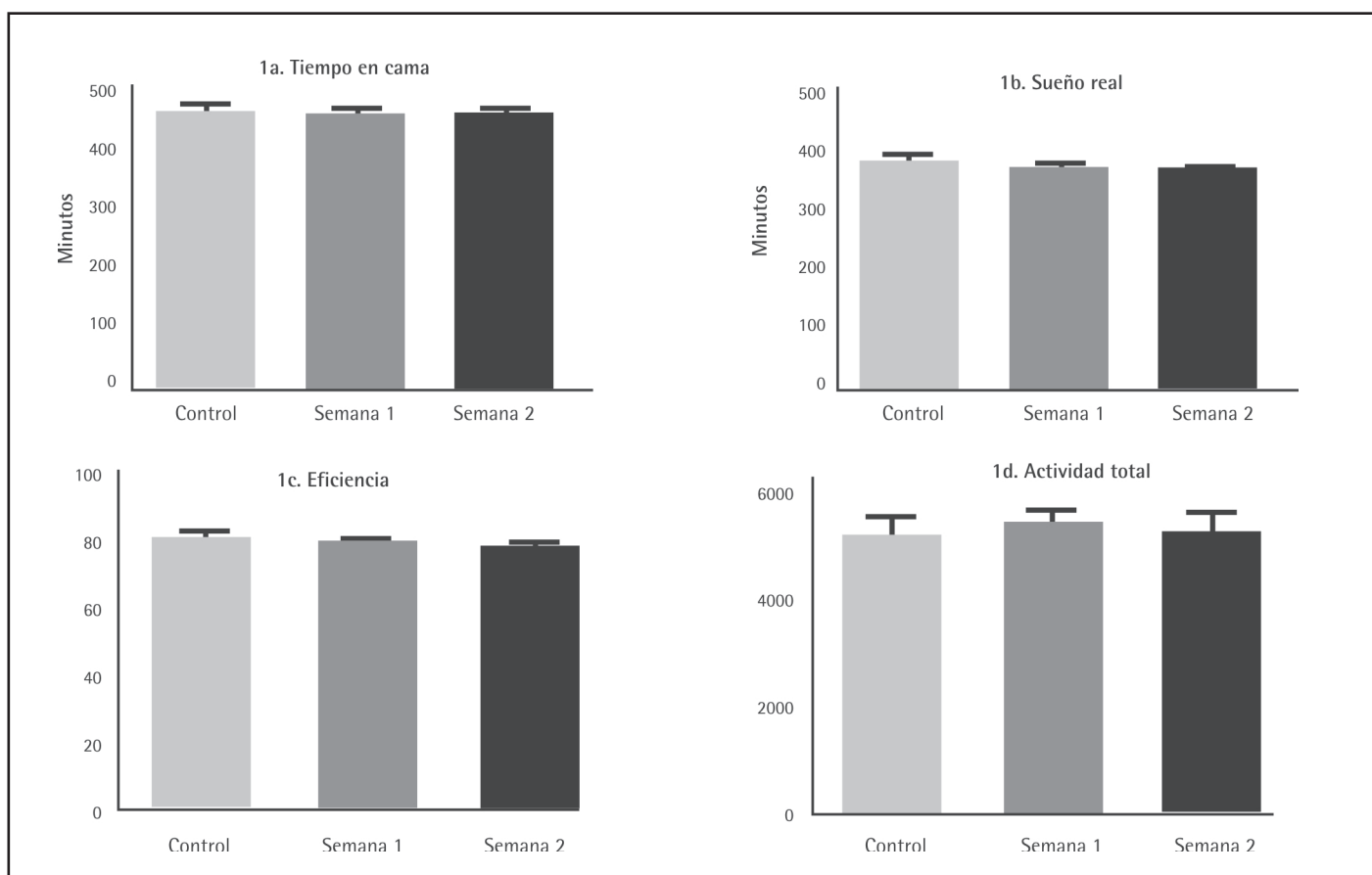


Figura 2. Resultados obtenidos ($\bar{X} \pm DE$) del parámetro Latencia de Sueño en alumnos en época de exámenes que tomaron cerveza sin alcohol en la cena (n=18). Control: semana que ingirieron su dieta habitual. Semana 1: del día 1 al 7 de tratamiento. Semana 2: del día 8 al 14 de tratamiento. *p-valor \leq 0.05 respecto al control.

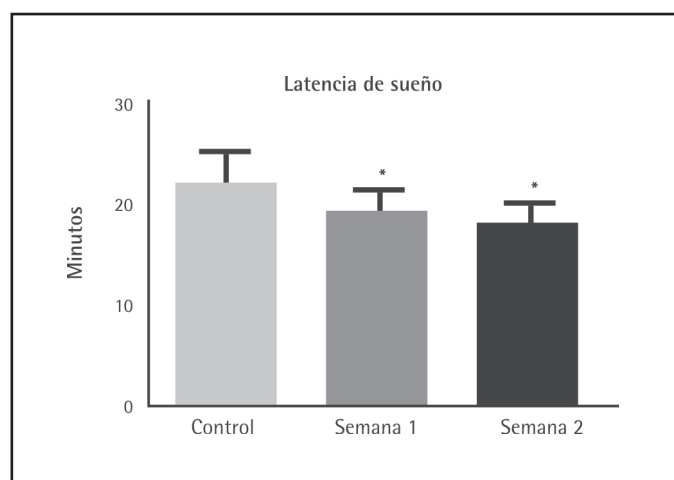


Figura 3. Índice de Calidad de Sueño de Pittsburg ($\bar{X} \pm DE$) de alumnos en época de exámenes tras la toma de cerveza sin alcohol por la noche. (n=28). Control: semana que ingirieron su dieta habitual. Semana 1: del día 1 al 7 de tratamiento. Semana 2: del día 8 al 14 de tratamiento. *p-valor<0.05 con respecto al control.

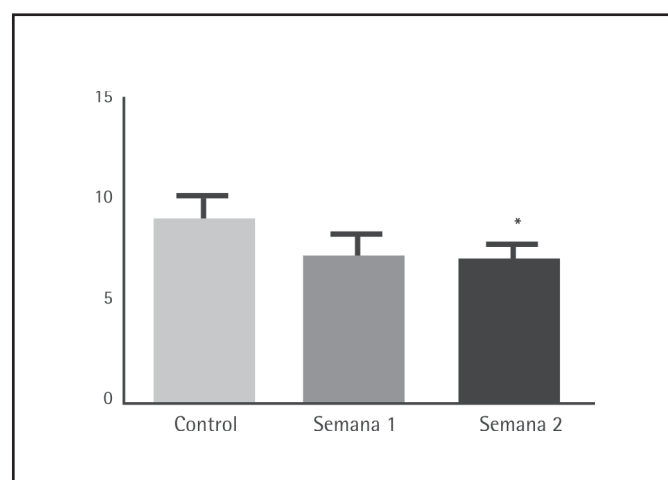


Tabla 3. Análisis de la ansiedad de la población femenina en estudio, que ingirió cerveza sin alcohol (330 ml) durante la cena.

Semanas	Ansiedad/Estado	Ansiedad/Rasgo
Control	24,25±11,58	21,67±8,52
Semana 1	24,25±12,82	23,24±10,27
Semana 2	20,56±13,19	22,31±9,00

Ansiedad ($\bar{X} \pm DE$) de n=15 alumnas mujeres. Control: semana que ingirieron su dieta habitual. Semana 1: del día 1 al 7 de tratamiento. Semana 2: del día 8 al 14 de tratamiento.

Ansiedad/ Estado para el Percentil 50 en población masculina=19. Spielberg et al., 2008.

en la semana de control: 21,06±10,05, siendo superior al valor correspondiente al Percentil 50, es decir: 19.

Si comparamos los valores de nuestras voluntarias con los publicados en 2008 por Spielberg et al., también se observó que inicialmente partíamos de condiciones de Ansiedad/Estado (A/E) elevadas, debido al estrés de los exámenes oficiales, corroborado con el valor: 24,25±11,58, superior al valor: 21 correspondiente al Percentil 50. Los resultados obtenidos en las jóvenes voluntarias que realizaron el estudio indican que el valor de la Ansiedad/Estado (A/E) obtenido para el control: 24,25±11,58, disminuyó tras la ingesta de cerveza sin alcohol en la cena durante dos semanas con un valor correspondiente de: 20,56±13,19 (Tabla 3).

Con respecto a la Ansiedad/Rasgo (A/R) indicar que los valores no se alteraron, para el total de la población que participó en el ensayo.

Discusión y conclusiones

En el presente ensayo se observa cómo el consumo de una cerveza sin alcohol durante la cena mejora la calidad de sueño nocturno mediante la técnica del *Actiwatch*® en nuestra población a estudio. Así, se observa una disminución en el parámetro registrado de la *Latencia de sueño*, es decir, con el consumo de cerveza sin alcohol en la cena se genera una reducción en el tiempo de aparición de sueño. Esta disminución es más significativa en la Semana 2 de la ingesta de la cerveza sin alcohol en la cena, esto es así debido al efecto tiempodependiente^{3,4} de los componentes de la cerveza. Este hecho representa una mayor calidad del sueño nocturno.

Respecto a los resultados obtenidos con la aplicación del *Cuestionario del índice de Calidad de Sueño de Pittsburgh*, se aprecia una mejora subjetiva del sueño, tanto en la primera como en la segunda semana de la toma de cerveza sin alcohol en la cena por parte de los voluntarios. Esta mejora es estadísticamente significativa en la Semana 2 de nuestro estudio. Esto se debe al

efecto tiempodependiente que responde a los componentes de la cerveza que actúan sobre el sueño^{3,16,17}.

En cuanto al *Cuestionario de Ansiedad/Estado (A/E)* los resultados nos muestran una tendencia en la disminución de la ansiedad, es decir, efecto ansiolítico en la población a estudio. En los varones, este efecto ansiolítico se muestra ya en la primera semana en que consumieron cerveza sin alcohol en la cena. Sin embargo, en mujeres, esta mejoría se observa en la segunda semana en la que se llevó a cabo nuestro ensayo.

Por tanto, el consumo de una cerveza sin alcohol en la cena ayuda a conciliar el sueño y de este modo evitar la cronodisrupción que se define como una importante perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y del comportamiento. Esta cronodisrupción depende, entre otros efectos, de que los relojes periféricos produzcan ritmos ordenados por el marcapasos central¹⁸. La cronodisrupción puede producirse por varias situaciones como el trabajo por turnos o el *jet-lag*. Con todo esto, la cronodisrupción está relacionada con un aumento del riesgo de desarrollar enfermedades o el aumento de patologías ya existentes como el envejecimiento prematuro, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad o el síndrome metabólico y por ello, la cronobiología puede utilizarse como una herramienta para combatir determinadas enfermedades¹⁹.

Además, en los últimos años, han sido de gran importancia los estudios sobre la composición de las plantas y los efectos de los fitonutrientes en la salud. Referente al lúpulo y a la cerveza sus mecanismos hipnóticos no son muy conocidos, no habiéndose estudiado el papel que juegan esta planta en dicha bebida fermentada^{20,21}. Por todo ello, este ensayo, tiene gran importancia ya que aporta resultados significativos obtenidos en humanos que consumieron estos fitonutrientes con propiedades sedantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración a los voluntarios estudiantes de la Universidad de Extremadura.

Esta investigación ha sido financiada a través del Plan I.D.T.I de la UEx, 2010 Acción VII. Proyectos de Iniciación a la Investigación y el Desarrollo Tecnológico; *Consejería de Salud y Política Social, Junta de Extremadura; Vicerrectorado de Investigación, Innovación e Infraestructura Científica*, Universidad de Extremadura; junto al Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

Bibliografía

1. Posada J. *Estudio recopilatorio "Cerveza y salud"*. Escuela Superior de Cerveza y Malta. Madrid: Centro de información Cerveza y Salud. 1998.
2. Sánchez CL, Franco L, Bravo R, Rubio C, Rodríguez AB, Barriga C, et al. Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria*. 2010;13(3):160-3.

3. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez A, Barriga C, Cubero J. The sedative effects of Hops (*Humulus lupulus* L.), a component of beer, in the rhythm of activity / rest. *Acta Physiol. Hung.* 2012;99(2):133-9.
4. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez AB, Barriga C, Romero E, et al. The sedative effect of non-alcoholic beer in healthy female nurses. *PLoSone.* 2012;7(7): e37290.
5. Meissner O, Haberlein H. Influence of xanthomol on the binding behavior of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Plant Med.* 2006;72:656-8.
6. Ahoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, et al. Effect of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J Agric Food Chem.* 2006;54:2514-1519.
7. Greene R, Siegel J. Sleep: a functional enigma. *Neuromolecular Med.* 2004;5(1):59-68.
8. Madrid JA, Sánchez Vázquez FJ, Rol MA. *Análisis del ritmo circadiano de sueño-vigilia, frecuencia cardíaca, presión arterial, flujo respiratorio máximo, temperatura corporal, fuerza muscular y velocidad de reacción.* Prácticas de cronobiología. Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. [Curso2002-03]. Disponible en:www.um.es/cronobio/ [accedido 2011 Noviembre 23].
9. González N. *El horario de verano un factor de producción de ansiedad.* Disponible en: www.monografias.com/trabajos11/ansi/ansi.shtml [accedido 2011 Noviembre 18].
10. Kozier B, Erb G, Berman A, Snyder S. *Fundamentos de enfermería: conceptos, proceso y práctica.* Madrid: McGraw -Hill; 2005.
11. Kivimaki M, Virtanen M, Elovainio M, Vaananen A, Keltikangas-Jarvinen L, Vahtera J. Prevalent cardiovascular disease, risk factors and selection out of shift work. *Scand J Work Environ Health.* 2006;32:204-8.
12. Marcuello García AA. *La ansiedad ante los exámenes.* Disponible en: www.psicologiaonline.com/autoayuda/examenes/ansiedad.shtml [accedido 2012 Marzo 15].
13. Jiménez-Genchi A, Monteverde-Maldonado E, Nenclares-Portocarrero A, Esquivel-Adame G, de la Vega-Pacheco A. Reliability and factorial analysis of the Spanish version of the Pittsburg Sleep Quality Index among psychiatric patients. *Gac Med Mex.* 2008;Nov-Dec;144(6):491-6.
14. Spielberger, R.L. Gorsuch, R.E. Lushene. *Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo*, C.D. Madrid. 2008
15. Jiménez-Genchi A, Monteverde-Maldonado E, Nenclares-Portocarrero A, Esquivel-Adame G, de la Vega-Pacheco A. Reliability and factorial analysis of the Spanish version of the Pittsburg Sleep Quality Index among psychiatric patients. *Gac Med Mex.* Nov-Dec; 2008;144(6):491-6.
16. Wohlfart R, Hansel R, Schmidt H. The sedative-hipnptic principle of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-2-ol. *Planta Med.* 1983;48:120-3.
17. Schiller H, Foster A, Vonhoff C, Hegger M, Biller A, Winterhoff H. Sedating effects of *Humulus lupulus* L extract. *Phytomedicine.* 2006;13:535-41.
18. Gómez-Abellán P, Madrid JA, Ordovás JM, Garaulet M. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinol Nutr.* 2012;59(1):50-61.
19. Martínez-Carpio PA, Corominas A. Introducción general a la cronobiología clínica y a la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. *Med Clin.* 2004;123(6):230-5.
20. Heber D. Vegetables, fruit and phytoestrogens in the prevention diseases. *J. postgrad. Med.* 2004;50:145-9.
21. Mayoraga M, Iborra A, Estany S, Martínez P. Protective effect of vitamin E in a animal model of LPS-induced inflammation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004;52:361-5.

2.2.2. Calidad subjetiva del sueño

2.2.2. Subjective sleep quality

Acta Physiologica Hungarica

A Periodical of the Hungarian Academy of Sciences

Managing Editor: Tamás Ivanics

Editorial Office and Correspondence

Semmelweis University

Institute of Human Physiology

H-1446 Budapest, POB. 448. Hungary

Fax: (36-1) 334-3162

E-mail: ivanics.tamas@med.semmelweis-univ.hu

Editor-in-Chief: Emil Monos

Semmelweis University

Institute of Human Physiology

H-1446 Budapest, POB. 448. Hungary

Phone: (36-1) 459-1500/60315

Fax: (36-1) 334-3162

E-mail: monos.emil@med.semmelweis-univ.hu

[www. akademiai.com](http://www.akademiai.com)

Prof. Javier Cubero Juárez (PhD)

Laboratory of Health Education

Experimental Sciences Education Area

University of Extremadura

SPAIN

March 13, 2014

Dear Professor Cubero Juárez,

I am pleased to inform you that your revised paper entitled: "Effect of non-alcoholic beer on subjective sleep quality of a university stressed population" (No: **46/13C**) has been accepted for publication by the Reviewers and the Editorial Board of Acta Physiologica Hungarica.

Your manuscript has been sent for editorial processing, after which we will keep you informed about the status of your article.

Thank you for choosing Acta Physiologica Hungarica!

Yours sincerely,

Tamas Ivanics, MD, PhD

Managing Editor

Acta Physiologica Hungarica

E-mail: ivanics.tamas@med.semmelweis-univ.hu

Effect of non-alcoholic beer on Subjective Sleep Quality in a university stressed population

L Franco¹, R Bravo¹, C Galán¹, A B Rodríguez¹, C Barriga¹, J Cubero^{1,2}

¹Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group,
Department of Physiology

²Laboratory of Health Education, Experimental Sciences Education Area.
University of Extremadura, Badajoz, Spain.

Running Title: *Benefit of Non-alcoholic beer on Sleep Quality.*

Address: Prof. Javier CUBERO (PhD)

-Laboratory of Health Education-

Experimental Sciences Education Area

University of Extremadura

Av/ de Elvas S/N

CP: 06006

Badajoz.

SPAIN.

Telephone: +34 924 286576

E-mail: jcubero@unex.es

Web: <http://www.unex.es/unex/grupos/grupos/nif>

Abstract:

Sleep deprivation affects the homeostasis of the physiological functions in the human organism. Beer is the only beverage that contains hops, a plant which has a sedative effect. Our objective is to determine the improvement of subjective sleep quality using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI). The sample was conducted among a population of 30 university students. The study took place during a period of 3 weeks, the first 7 days were used for the control, and during the following 14 days the students ingested beer (were asked to drink beer) while having dinner. The results revealed that Subjective Sleep Quality improved on those students who drunk one beer during dinner compared to those who did no, this is corroborated by the fact that Sleep Latency decreased ($p < 0.05$) in relation to Control. The overall rating Global Score of Quality of Sleep also improved significantly ($p < 0.05$). These results confirm that the consumption of non-alcoholic beer at dinner time helps to improve the quality of sleep at night.

Key words: PSQI, hop, stress, sleep, beer.

Introduction:

Sleep is defined as a state of unconsciousness from which a person can be aroused by sensory stimuli. Many people suffer from sleep deprivation, in fact, epidemiological studies have shown a high prevalence of this condition (one third of the population have some kind of sleep disorder in their life; Rey de Castro and Vizcarra, 28). Sleep deprivation, among other conditions, affects the functions of the central nervous system (CNS), (13,29). This prolonged state of wakefulness is often associated with a progressive decline of mental processes and even abnormal behavior (13,26) A young person needs an average of 7-8 hours sleep in a 24 hour period to feel awake and alert during the day (15). If this average number of hours of sleep needed is reduced a person can suffer from partial or total sleep deprivation. Total sleep deprivation occurs if a person does not sleep well, a common example of this is when students are sitting their exams (43). An example of partial sleep deprivation is a night shift for a doctor in a hospital (5,40).

On the other hand, hop (*Humulus lupulus*) is a plant used by the food industry due to its aromatic characteristics and this is the main reason why it is used in beer production. It contains bitter acids that make it sedative, and in particular in the products of oxidative degradation, such as those resulting from the degradation of α -acids, a clear example of this is 2-methyl-3-buten-2-ol (). We also find in beer other active components of sleep such as polyphenol: xanthohumol (24) and terpene: myrcenol (2). The mechanism of the action of these components are to the activity of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) by modulating brain GABA(A) receptors (24), thus inhibiting the central nervous system. In particular, this effect of hops on the nervous system has been reported in animal model studies (11,21,44), it also has the narcotic effect of high concentrations of hop extract due to its aforementioned 2-methyl-3-buten-2-ol component (9,42). Basic research on hops has been used to help healthy stress free human population to sleep (31,38). An example of this is sedation treatment with valerian and hop combinations (34). This treatment has been used to correct temporary sleep onset and sleep interruption disorders. This combination has also been successful in improving sleep quality in clinical trials done with insomnia patients (18) and with patients suffering from non-organic sleep disorder (1). These results reflect the action of hop components on the inhibitory neurotransmitter GABA (A), an action which can also be exerted by other components in beer (2).

Besides the central effect of these components on GABA, there is an effect on another neurotransmitter involved in nocturnal sleep, serotonin (22) and also on the activation of the melatonin hormone, an endocrine agent that entrains circadian rhythms (33,39). The effect on the neuronal receptors of adenosine, which are extensively involved in the mechanism of sleep, can not be ignored either. Therefore, beer and its hop component could enhance the CNS's neuroendocrine response via GABA, adenosine, and the biogenic amines serotonin and melatonin with an effective sedative action that both entrain the sleep/wake rhythm and improve the induction of sleep (32).

In general terms the effect that hop has on human sleep is corroborated by different trials carried out with other medical plants like *Valeriana officinalis* and *Melissa officinalis* and the results were positive (9).

On the other hand, beer has nutritional properties, low calories and contains protein compounds, minerals, trace elements, vitamins A, D and E, polyphenols and carbon dioxide, which taken with moderation can be beneficial for a person's health (27). It is also the only drink that contains hops (*Humulus lupulus*), a plant with sedative properties. Hop contains α -acids bitter, 2-methyl-3-buten-2-ol, acting on neurotransmitter GABA effects, the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system; it also contains xanthumol and myrcenol both of them are present in the hop of the beer, providing it its sedative properties that act in the same way as α -acids bitter on the neurotransmitter GABA (11, 38).

Our objective is to determine the effect of non-alcoholic beer in Subjective Sleep Quality, using the Pittsburgh Sleep Quality Index using as sample a population of students who are under exam stress.

Material and methods:

The research was carried out on a population of 30 university students who volunteer to do it. The students who participated in the research were healthy, they were not under or overweight and they were not taking any medication or stimulant or drink consumption that might have influenced the outcome of the research. Table I shows the anthropometric characteristics of the sample population. This population consisted of 15 women and 15 men (n=30). This project was approved by the Bioethics Committee of the University of Extremadura.

The subjects enrolled to participate in our research, were stressed as the experiment was carried out during the official university exam period in February 2012. This stress is observed by increasing the variable Anxiety/State (A/E) in the State-Trait Anxiety Inventory, both groups of participants (males and females) were higher than the 50 percentile obtained from the scale published by Spielberg et al. (37).

We chose a longitudinal and crossed intervention model in which each subject was his own control. The experimental period was 3 weeks, the first 7 days were used for the control, when participants did not have any beer intake (Control Week). During the following 14 days (Weeks 1 and 2), the participants ingested 330 mL of alcohol-free beer (*Mahou Laiker Without*[®]) during their dinner time. The Pittsburgh Sleep Quality Index questionnaire was completed by all the participants at the end of each one of the three weeks that the trial lasted.

Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI): This questionnaire assesses subjective sleep quality. On one hand it provides the overall rating of sleep quality and on the other hand it provides partial subjective data in seven distinct components: Sleep Quality, Latency, Duration, Efficiency, Disturbances, use of Hypnotic medication and Daytime dysfunction. The questions asked were related to the sleep during the last week. The score of the seven components ranges from 0 (no difficulty) to 3 (severe difficulty) and the Global Score has a range from 0 (no difficulty) to 21 (hard on all components) (17, 35,43).

State-Trait Anxiety Inventory (STAI): This questionnaire consists of two sections, each containing 20 questions. The questions on the first section are about Anxiety/State (A/E), which assesses the transitory emotional state characterized by subjective feelings, consciously perceived attention and apprehension and autonomic nervous system hyperactivity. The second section asks questions about Anxiety/Trait (A/R), relatively stable characteristic of individuals with a tendency to perceive situations as threatening. The application time is 20 minutes and the population is spread by sex (37).

Statistical treatment of data: For the resolution statistical data were obtained by Prisma[®] software v.5.50 for Windows[®] environment. A descriptive study was conducted the Mean (\bar{x}) \pm Standard Deviation (SD) were calculated. These are formulas commonly used for the type of data handled. For the inferential study a paired T-test was performed. Due to the fact that the size of the sample was variable, we applied the Kolmogorov-Smirnov test for normality of the data. Having determined that the population was for the Normal, the results were analyzed by t-test comparing two groups. Significant values were determined as those with p-value <0.05.

Results:

We must start by clarifying that higher numerical values represent poorer sleep quality when analysing the results obtained in the PSQI.

The results indicate that due to the consumption of non-alcoholic beer during dinner time and to the sedative properties of this drink, Sleep Quality (Figure 1), increased slightly. This increase in sleep quality is expressed with less sleep fragmentation, manifested in fewer awakenings during the night and a normal progression of the states and stages of sleep.

Regarding Sleep Latency (Figure 2), the time that it took sleep to appear was statistically significantly reduced ($p < 0.05$).

Sleep Duration (Figure 3) had no significant fluctuations over the 3 weeks of the experiment.

Sleep Efficiency improved slightly (Figure 4) but it was not statistically significant. This improvement was caused by the decrease of both the latency and by the slight improvement in Sleep Quality.

Disturbance Sleep (Figure 5) which took place during night time decreased, although this decrease was not statistically significant after taking a non-alcoholic beer at dinner time

On this matter of the use of Hypnotic Medication (Figure 6), the Pittsburgh Sleep Quality Index questionnaire reflects no statistically significant changes during the period of the study, given that our population was not under any drug treatment meant to fight sleep disturbance.

Consuming a non-alcoholic beer at dinner time improved slightly Daytime Dysfunction (Figure 7),

Finally, the subjective Global Score (Figure 8), indicates that the sleep improvement caused by drinking a non-alcoholic beer at dinner time was statistically significant ($p < 0.05$).

Discussion:

Marin et al. (23) have shown that in a university population, academic and staff factors could precipitate sleep deprivation, and therefore increased daytime sleepiness. In addition we have seen that the amount and quality of sleep are diminished as a result of increased environmental and psychosocial demands on the student (7).

On the other hand we must remember the influence of food and diet is more than proven on the physiological function of sleep (42,43).

It is advisable to ingest non-alcoholic beer at dinner since by its sedative activity produces this subjective improvement of sleep at night. This is recommended, especially in a population under high stress like college students during exam time. A good quality of sleep has to do not only with sleeping well at night but also with a good performance during wakefulness (23). This is important because if they have a good sleep, our student population will have a good wakefulness which means higher performance in daily study activities.

Sleep Latency, the time that takes for someone to fall asleep, is significantly reduced due to the sedative properties that are present in the components of beer: hops, xanthomol and myrcenol. These components act as modulating receptors of the neurotransmitter GABA, which is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and therefore, one of the main molecules responsible of the cause sleep (14,20,45). The decrease in the result of Sleep Latency together with the slight improvement in Sleep Quality are the possible reasons of the increase in Subject Sleep Efficiency, which improved efficiently.

Sleep disorders decreased during night time after taking a non-alcoholic beer at dinner. This is due to the sedative effect of non-alcoholic beer (38).

On the matter of the Use of Medication, the Pittsburgh Sleep Quality Index reflects no statistically significant changes during the period of the study, given that our population was not under any drug treatment prescribed against sleep disturbance.

Without being a significant improvement consuming a non-alcoholic beer at dinner improved Daytime Dysfunction.

Finally, the subjective Global Score indicated that sleep improved significantly by drinking a non-alcoholic beer at dinner time. This would be optimal for our sample because it has been shown that sleep loss, and therefore, increased daytime sleepiness have a negative effect on

vigilance, memory, language and cognitive and academic results (3,6,8,25,30). Other studies have shown that sleep deprivation adversely affects executive functions such as the ability to make decisions (18), integrate emotion and it also affects the cognition to guide moral judgments (19). Sleep loss also has other known consequences on mental health, such as mood swings, depression, higher stress (4,19,36) and the abuse of substances like narcotic (16). There are also repercussions on family and social life like negative effects on personal relationships and a decrease in the amount of time spent with family (12).

Our study had some limitations. One of them is that the questionnaires were self-administered, based on the subjective judgment of the people who participated in the research. Because of this, the information collected may have had memory slants. Furthermore, as the quality of sleep and sleepiness are subjective variables, they could be tied to individual variability and be underestimated or overestimated by the people who took part in the research (12,41).

Similar results using technical analysis, like the Actigraphic method by Actiwatch, were obtained by the authors (10) using a population of health workers under the stress of rotating shifts. Sleep Latency and Total Activity decreased after having a non-alcoholic beer at dinner time for a period of 2 weeks. This study consisted in taking a first week (7 days) as control. Then volunteers ingested a non-alcoholic beer every night for 14 days. In this assay, the results were also collected using objective techniques by Actimetry: Actiwatch and Sleep Analysis software. The results obtained by this method support the assessment of subjective sleep quality evaluated by the Pittsburgh Sleep Quality Index presented in this paper.

We can summarize the results of this paper by saying that the consumption of non-alcoholic beer at dinner time by people who are under stress is recommended to improve the quality of sleep.

Acknowledgments:

This research has been funded by The Government of Extremadura, (Fondos FEDER), PII-Acción VII-UEx 2010 and the Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

References:

1. Abourashed EA, Koetter U, Brattstrom A: In vitro binding experiments with a valerian, hops and the fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptor. *Phytomedicine* 11, 633-638, (2004)
2. Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, Yoshinobu K: Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J. Agric. Food Chem.* 54 2514-1519, (2006)
3. Arnedt JT, Owens J, Crouch M, Stahl J, Carskadon MA: Neurobehavioral performance of residents after heavy night call vs after alcohol ingestion. *JAMA.* 294, 1025-1033 (2005)
4. Bellini LM, Baime M, Shea JA: Variation of mood and empathy during internship. *JAMA.* 287, 3143-3146 (2002)
5. Bellini LM, Shea JA: Mood change and empathy decline persist during three years of internal medicine training. *Acad Med.* 80, 164-167 (2005)
6. Bonnet MH: Effect of sleep disruption on sleep, performance, and mood. *Sleep.* 8,11-19, (1985)
7. Carskadon MA: Patterns of sleep and sleepiness in adolescents. *Pediatrician.* 17, 5-12, (1990)
8. Curcio G, Ferrara M, De Gennaro L: Sleep loss, learning capacity and academic performance. *Sleep Med. Rev.* 10, 323-337 (2006)
9. Dimpfel W, Suter A: Sleep improving effects of a single dose administration of valerians/hops fluid extract-a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in parallel design using electrohypnograms. *Eur. J. Med. Res.* 26, 200-204, (2008)
10. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodriguez AB, Barriga C, Romero E, Cubero J: The sedative effects of non-alcoholic beer in healthy female nurses. *PLOS ONE.* 7 (2012a)
11. Franco L, Sanchez C, Bravo R, Rodriguez A, Barriga C: The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiol. Hung.* 99, 133-139 (2012b)

12. García López P, Capote Gil F, Quintana Gallego ME: Valoración mediante escala de Epworth de la somnolencia diurna en pacientes con sospecha de síndrome de apneas obstructivas durante el sueño. Diferencias entre los pacientes y sus parejas. Arch. Bronconeumol. 36, 608-611 (2000)
13. Greene, R., Siegel, J: Sleep: a functional enigma. Neuromolecular Med. 5, 59-68. Review (2004)
14. Hänsel R, Wohlfart R, Coper H: Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops, II. Z. Naturforsch. C. 35, 1096-1097 (1980)
15. Howard SK: Sleep deprivation and fatigue. En: Miller RD. Anesthesia. 5th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2637-2646 (2000)
16. Hsu Wen, Chiu Nan, Liu Jui, Wang Chieh, Chang Ting, Laido Yi, Kuo Pei: Sleep quality in heroin addicts under methadone maintenance treatment. Acta Neuropsychiatr. 24, 356-360 (2012)
17. Jimenez-Genchi A, Monteverde-Maldonado E, Nenclares-Portocarrero A, Esquivel-Adame G, de la Vega-Pacheco A: Reliability and factorial analysis of the Spanish version of the Pittsburg Sleep Quality Index among psychiatric patients. Gac. Med. Mex. 144, 491-496 (2008)
18. Killgore WDS, Balkin TJ, Wesensten NJ: Impaired decision making following 49 h of sleep deprivation. J. Sleep Res. 15, 7-13 (2006)
19. Killgore WDS, Killgore DB, Day LM, Li C, Kamimori GH, Balkin TJ: The effects of 53 hours of sleep deprivation on moral judgment. Sleep. 30, 345-352 (2007)
20. Koether U, Schrader E, Kaufeler R, Brattstrom A: A randomized double blind, placebo-controlled, prospective clinical efficacy of fixed valerian hops extract combination (Ze 91019) in patients suffering from non-organic sleep disorder. Phytother. Res. 21, 847-851 (2007)
21. Lee KM, Jung KS, Song DK, Krauter M, Kim HY: Effects of Humulus lupulus extract on the central nervous system in mice. Planta Med. 59(Suppl): A691, (1993).
22. Maldonado M, Moreno H, Calvo JR: Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. Clin. Nutr. 28, 188-191 (2009)

23. Marín HA, Sosa S, Vivanco D, Aristizábal N, Berrio MC, Vinaccia S: Factores culturales que privan el sueño y causan somnolencia excesiva en estudiantes universitarios: un estudio piloto. *Psicol. Salud.* 15, 57-68 (2005)
24. Meissner O, Haberlein H, Influence of xanthohumol on the binding behaviour of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Planta Med.* 72, 656-658 (2006)
25. Philibert I: Sleep loss and performance in residents and nonphysicians: a meta-analytic examination. *Sleep.* 28, 1392-1402 (2005)
26. Pilcher JJ, Huffcutt AI: Effects of sleep deprivation on performance: a meta-analysis. *Sleep.* 19, 318-326 (1996)
27. Posada J (1998): Estudio recopilatorio Cerveza y Salud. Escuela Superior de Cerveza y Malta. ESCEMA. Madrid. Spain.
28. Rey de Castro J, Vizcarra D, Álvarez J: Somnolencia diurna y síndrome apnea hipopnea del sueño—asociación entre parámetros antropométricos y puntaje Epworth en polisomnografía convencional y de noche partida. *Rev. Soc. Peru Med. Interna.* 16, 74-83 (2003).
29. Rey de Castro J, Vizcarra D: Limited value of Epworth Modified Scale for hypersomnia assessment in 57 patients submitted to polisomnography. 24th International Congress of Internal Medicine. PS 134 (1998)
30. Rodrigues RND, Viegas CAA, Abreu e Silva AAA, Tavares P. Daytime sleepiness and academic performance in medical students. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 6-11 (2002)
31. Salter S, Brownie S: Treating primary insomnia—the efficacy of valerian and hops. *Aust. Fam. Physician.* 39, 433-437 (2010)
32. Sánchez CL, Franco L, Bravo R, Rubio C, Rodríguez AB; Barriga C, Cubero J: Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria.* 13, 160-163, (2010)
33. Schellenberg R, Sauer S, Abourashed E, Koetter U, Brattstrom A: The fixed combination of valerian and hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med.* 70, 594-597 (2004)
34. Schmitz M, Jackel M: Comparative study for assessing quality of life of patients with exogenous sleep disorders (temporary sleep onset and sleep interruption disorders)

treated with hops-valerian preparation and benzodiazepine drug. *Wien Med. Wochenschr.* 148, 291-298 (1998)

35. Sierra JC, Jiménez-Navarro C, Martín-Ortíz JD: Calidad del sueño en estudiantes universitarios: importancia de la higiene del sueño. *Salud Mental.* 25, 35-43 (2002)

36. Smith-Coggins R, Rosekind MR, Hurd S, Buccino KR: Relationship of day versus night sleep to physician performance and mood. *Ann. Emerg. Med.* 24, 959-961 (1994)

37. Spielberger, R.L. Gorsuch, R.E. Lushene. (2008): Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo, C.D. Madrid,

38. Vonderheid-Guth B, Todorova A, Brattstrom A, Dimpfel W: Pharmacodynamic effects of valerian and hops extract combination (Ze 91019) on the quantitative-topographical EEG in the healthy volunteers. *Eur. J. Med. Res.* 5, 139-144 (2000)

39. Weeks BS: Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian. *Med. Sci. Monit.* 15, 256-262, (2009)

40. Weinger MB, Ancoli-Israel S: Sleep deprivation and clinical performance. *JAMA.* 287, 955-957 (2002)

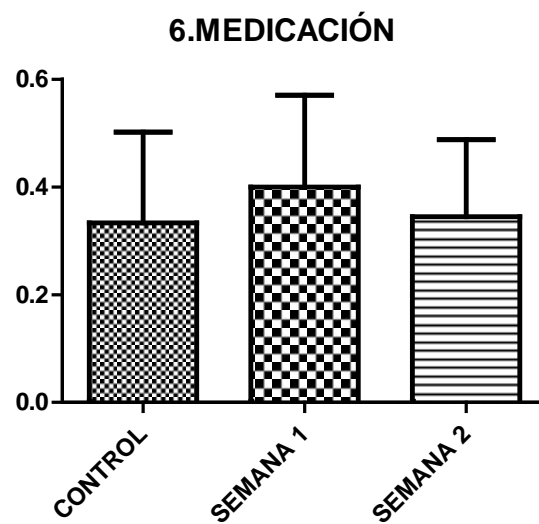
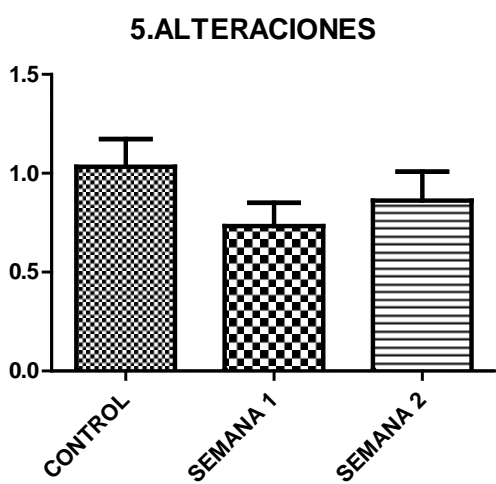
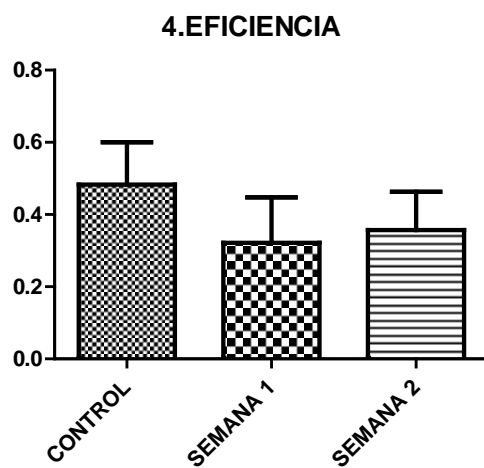
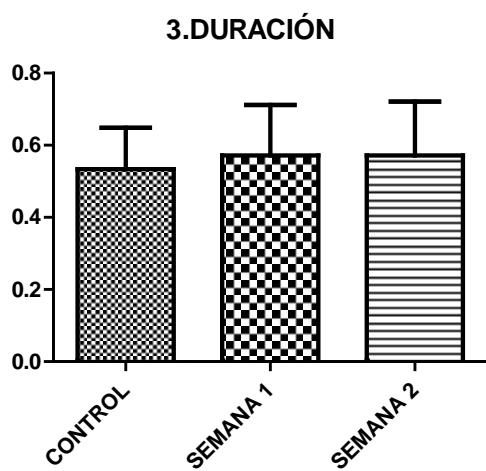
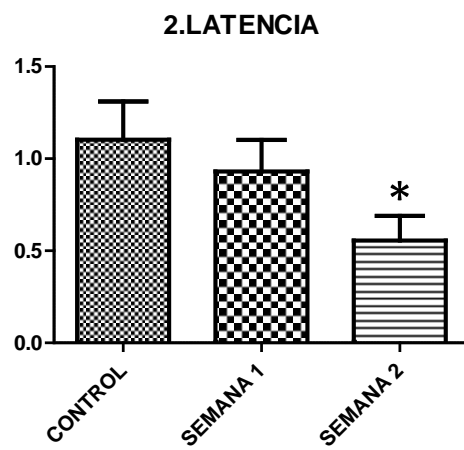
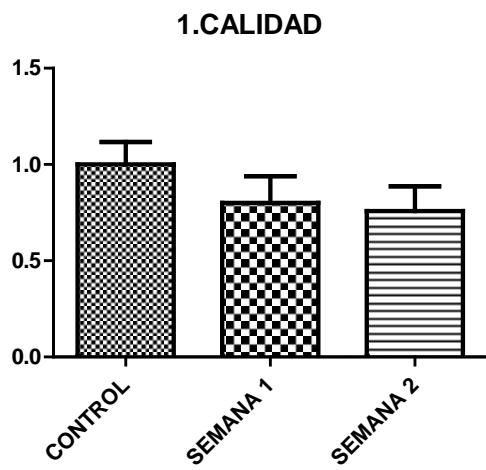
41. Wiggins CL, Schmidt-Nowara WW, Coultas DB, Samet JM: Comparison of self- and spouse reports of snoring and other symptoms associated with sleep apnea syndrome. *Sleep.* 13, 245-252 (1990)

42. Wohlfart R, Hansel R, Schmidt H: The sedative-hypnotic principle of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-ol. *Planta Med.* 48, 120-123 (1983)

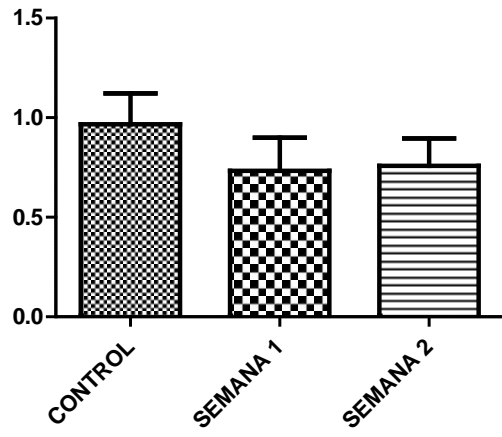
43. Yasuhiro I, Nakayama A, Kanbe H, Miwako K, Saito Y, Adachi M, Kondo N, Tadayuki I: A knowledge about the relationship between dietary habits and sleep quality. *J. Anal. Bio-Science* 36, 2 181-185 (2013)

44. Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia R, Avallone R, Baraldi M: Evidence the β -acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J. Ethnopharmacol.* 109, 87-92 (2007)

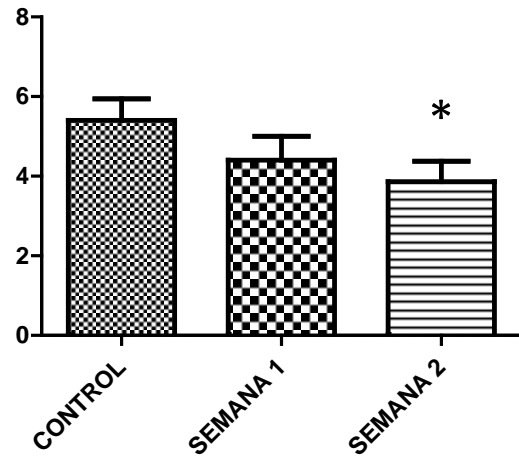
45. Zanolli P, Zavatti M: Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 116, 383-396 (2008)



7.DISFUNCIÓN



CALIFICACIÓN GLOBAL



2.2.3. Neuromoléculas implicadas en la ansiedad:
Cortisol, Serotonina y Melatonina

2.2.3. Neuromolecules involved in anxiety: Cortisol,
Serotonin and Melatonin

Effect of non-alcohol beer on anxiety: relationship of 5-HIAA

¹Franco L, ¹Galán C, ¹Bravo R, ¹Bejarano I, ²Peña E, ¹Rodríguez A, ¹Barriga C, ^{1,3}Cubero J

¹*Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, Department of Physiology.*

²Department of Pharmacology.

³*Health Education Laboratory, Experimental Sciences Education Area.*

University of Extremadura. Badajoz.

Campus de Excellence: HIDRANATURA.

Prof. Javier CUBERO JUÁNEZ (PhD)

-Laboratory of Health Education-

Experimental Sciences Education Area

University of Extremadura

Excellence Campus HIDRANATURA

Av. Elvas s/n 06006 Badajoz, SPAIN

E-mail: jcubero@unex.es

ABSTRACT

It is known that the main neuroendocrine signal from stress is the release of the hormone cortisol, alongside with the altered levels of the hormone melatonin and the neurotransmitter serotonin. In addition, hops (*Humulus lupulus L.*) have sedative and hypnotic properties. This cannabinacea plant is present in beer as flavoring and preservative. Also non-alcoholic beer possesses an important essential amino acid: Lysine, with relaxing effects. Therefore, our aim was to analyze the possible anxiolytic effect of non-alcoholic beer on neuroendocrine levels of cortisol, melatonin and serotonin, in a population under stress. An university population was enrolled (22 ± 1 years), healthy but under the stress of official academic exams ($n = 16$, 10 females and 6 males). They consumed 1 non-alcoholic beer (330 ml) during dinner for 14 nights. Hormones and neurotransmitter levels were measured through excretion metabolites in urine collected at the end of each week (09:00 A.M), using ELISA kit (DRG[®]) Cortisol, 6-Sulfatoximelatonina (6-SOM) and 5-Hidroxi 3-Indol Acetic Acid (5-HIAA). This enrolled population was their own control. The statistical analysis after finding that they followed a normal distribution was; Descriptive (Mean \pm Standard Error) and Inferential using Wilconson test. The most significant results in this population with the parameter of Anxiety/State were in the 50th percentile (24 ± 4.24) and after drinking non-alcoholic beer for 14 nights this parameter decreased significantly (18.13 ± 2.9) ($p < 0.05$). But without doubt, the most decisive result was the statistically significant decrease ($p < 0.05$) of the nocturnal serotonin levels after the ingestion of non-alcoholic beer during dinner, indicated by the decisive decrease in 5-HIAA first thing in the morning ($5.55 \pm 0.95 \text{ mg} / \text{L} = \text{mg}/24$) compared with its Control ($8.8 \pm 0.5 \text{ mg} / \text{L} = \text{mg}/24$). We can conclude that a population under stress, after ingesting non-alcoholic beer for 14 nights, improves its anxiolytic response through the serotonergic pathway.

Keywords: Non-alcohol beer, hops, lysine, serotonin, anxiety.

INTRODUCTION

Hops (*Humulus lupulus*, fam. Cannabaceae) are a perennial dioecious herb whose crops have an economical importance for the brewery industry. For centuries, this plant has provided flavor and aroma to beer (1) and has been considered as a sedative (2). The importance of the female plants (the only ones cultivated for brewery) lies in the lupulin glands, which are developed at the base of the bracteoles (3), and contain resins and essential oils required for the flavor and aroma of beer (4).

The sedative activity of hops lies mainly in its bitter acids: the α -acids (or humulones) which are very sensitive to oxidation (5) and generate 2-methyl-3-buten-2-ol (6). Also the polyphenol xanthohumol (7) and the terpene myrcenol (8). The main mechanism of action of hops is by increasing the activity of neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) through modulation of brain GABA A receptors (9, 10, 11), thus inhibiting the central nervous system (CNS). Also hops modulate serotonin central nervous system receptor (12) and may act through modification levels of serotonin (13) generated by chronic social defeat stress in rats (14).

Also Lysine is one of the most important essential amino acids in hops and in non-alcoholic beer, with a concentration of 12mg/100ml (15, 16) which significantly reduce chronic anxiety in human assay (17). L-Lysine acts like a partial 5HT4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies in rats (18) and also reduces the anxiety and lessens stress in humans (19).

It has been reported that hops may be beneficial both in animal and human populations as an aid to sleep, among others health disorders, like obesity and anti-inflammatory or antithrombotic effects. In addition to the non-alcoholic beer consumption in people with sleep problems, the sedative action associated with the components of hops and the amino acid lysine has been used to correct temporary sleep latency and sleep fragmentation disorders in human populations (20).

Induced sleep is a physiological process in which molecules, like the neurotransmitter GABA, the indolamines serotonin and melatonin, or some hormones like cortisol among other molecules, are involved. Therefore, our aim was to analyze the possible anxiolytic effect of non-alcoholic beer on the neuroendocrine levels of cortisol, melatonin and serotonin, in a population under stress.

MATERIALS AND METHODS

Subject

The research was carried out on a population of 16 university students who volunteered to do it. The students who participated in the research were healthy, they were not under or overweight and they were not taking any medication, stimulant or drink consumption that might have influenced the outcome of the research. Table 1 shows the anthropometric characteristics of the sample population. This population consisted of 10 women and 6 men (n=16). This project was approved by the Bioethics Committee of the University of Extremadura.

The subjects enrolled to participate in our research, were stressed as the experiment was carried out during their official university exam period in February 2013. This stress is observed by increasing the variable Anxiety/State (A/E) in the State-Trait Anxiety Inventory, both groups of participants (males and females) were higher than the 50 percentile obtained from the scale published by Spielberg et al. (21).

Experimental Design

We chose a longitudinal and crossed intervention model in which each subject was his own control. The experimental period was 3 weeks; the first 7 days were used for the control, when participants did not have any beer intake (Control Week). During the following 14 days (2 Weeks), the participants ingested 330 mL of non-alcohol beer (Mahou Laiker Without®) during their dinner. The State-Trait Anxiety Inventory was completed by all the participants at the end of each one of the three weeks that the trial lasted. Hormones and neurotransmitter levels were measured through the excretion of metabolites in urine collected in the morning (09:00 A.M) at the end of each week).

State-Trait Anxiety Inventory (STAI): This questionnaire consists of two sections, each containing 20 questions. The questions on the first section are about Anxiety/State (A/S), conceptualized as a transitory, subjective, emotional state or condition of the human organism, of tension and apprehension, and hyperactivity of the autonomic nervous system. The second section asks questions about Anxiety/Trait (A/T), a relatively stable characteristic of individuals with a tendency to perceive situations as threatening. The time for the test is 20 minutes and the population is spread by sex (21).

Analytical methods: To determine the hormones levels: Cortisol, 6-Sulfatoximelatonina (6-SOM) and neurotransmitter levels: 5-Hidroxi 3-Indol Acético (5-HIAA), a competitive enzyme immune essay method

ELISA kit (DRG©) was used, through electrochemoluminescence in a NanoQuant InfiniteN200 150 modular reader, with wavelength a 450 nm absorbance. All the analytical determinations were performed by duplicate.

Statistical treatment of data: For the resolution, statistical data was obtained by Prisma® software v.5.50 for Windows® environment. A descriptive study was conducted where the Mean (\bar{x}) \pm Standard Deviation (SD) was calculated. These are formulas commonly used for the type of data handled. For the inferential study, a paired T-student test was performed. Due to the fact that the size of the sample was variable, we applied the Kolmogorov-Smirnov test for normality of the data. Having determined that the population was not in the Normal, the results were analyzed by T-student test comparing two groups. Significant values were determined as those with p-value <0.05 .

RESULTS

The most significant values in this population with Anxiety/State in the 50th percentile (24 ± 4.24) were that after drinking non-alcoholic beer for 14 nights, in the Table 2, the Anxiety/State decreased (18.13 ± 2.9) statistically significantly ($p < 0.05$). And Cortisol levels (Table 3) decreased moderately ($153.74 \pm 0.96 \mu\text{g/ml}$) compared to its Control ($156.58 \pm 1.10 \mu\text{g/ml}$). On the other hand, non-substantial changes were shown in urinary 6-SOM values (Table 3), ($91.35 \pm 15.89 \mu\text{g/ml}$) versus its control ($98.11 \pm 12.68 \mu\text{g/l}$).

But without doubt, the most convincing result was the statistically significant decrease ($p < 0.05$) of nocturnal serotonin levels after the ingestion of non-alcoholic beer at dinner (Table 3), indicated by the determinant decrease in 5-HIAA early in the morning ($5.55 \pm 0.95\text{mg/l}$) compared to its Control ($8.8 \pm 0.5\text{mg/l}$).

DISCUSSION

Stress activates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, a process that is characterized by a rise in the systemic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) followed by the release of glucocorticoids. The increase of glucocorticoids is necessary to supply the energy and to induce the arousal state against stressful situations. Also the hyperactivity of the HPA axis is implicated in the pathogenesis of depression. This physiological and psychological abnormality generates disturbances in the serotonin (5-HT) neurotransmission exhibiting an increase (striatum, frontal, cortex) or a decrease (amygdala, lateral septum) in the release of 5-HT (22). In addition, the interesting assays of Keeney et al. (14), have demonstrated that the Hippocampal Serotonin release, measured via microdialysis, generated chronic social stress in rats. The importance of this limbic structure, the

hippocampus, is that it is a brain region involved in the co-ordination of behavioral and physiological response to stress, and because it is densely innervated by serotonergic nerve terminals (14).

But the difficult part in our research was the different central nervous system (CNS) 5-HT recapture and 5-HT metabolism in the periphery. Measurements of urinary metabolites of 5-HT cannot directly assess the CNS. It has been known for decades that the majority of urinary 5-HIAA seems to come from peripheral sources such as gastrointestinal enterochromaffin cells that contain large amounts of 5HT (23).

With respect to our decreased urinary levels of 5-HIAA after the ingestion of non-alcoholic beer to explain that it could be generated by the anxiolytic effect of hops (6, 7, 8) and lysine (18), it has been irrefutably proved by the sedative effect of non-alcoholic beer on a stressed population (20, 24, 25), because abnormal urinary levels of 5-HIAA have been associated to generalized anxiety disorder (GAD) (26, 27) and the severity of the Hamilton Anxiety Rating Scale (28). In particular, increased 5-HIAA levels were correlated with the Hamilton somatic subscale (items 7 to 13,) with items related to somatic signs of anxiety: tension, intellectual difficulties, somatic-muscular symptoms, somatic sensory symptoms, and genitourinary symptoms.

Also, in humans, a 3-month randomized double-blind study tested if lysine fortification of wheat reduced anxiety and stress in poor Syrian communities. In the lysine-fortified group, lysine significantly reduced chronic anxiety measured by the trait anxiety inventory in males. Lysine also reduced the plasma cortisol response to the blood drawing caused by stress in females, like was sympathetic arousal in males measured by skin conductance. These results suggest that some stress responses in economically weak populations consuming cereal-based diets can be improved with lysine fortification (17). And lysine dietary deficits in experimental animals (prolonged) increases stress-induced anxiety, which is reverted by prolonged Lysine treatment that has been shown to have anxiolytic effects in normally fed stressed rats. L-Lysine acts like a partial 5-HT₄ receptor antagonist, and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. Agonists of 5-HT₄ receptor increase propulsive mobility in the mesenteric plexus and antagonists prevent it, and modulate visceral pain and anxiety in humans and animals (18, 29, 30). Thus, Lysine has been proposed as a potential therapeutic tool in the treatment of stress-related intestinal disorders, in which there is a diagnosis of 5-HT sensitization and concurrent anxiety disorder.

In conclusion, stress has been shown to modulate the expression and binding of 5-HT and 5-HT level, rate of synthesis, release, uptake, and reception in a variable manner with a type of stressor in brain regional differences, and in particular in the peripheral regions, mainly in gastrointestinal tract (GIT) with the 5-HT₄

receptor by anxiety. We conclude therefore that the population enrolled with stress, after drinking non-alcoholic beer for 14 nights, improves anxiolytic response through via serotonergic.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been funded by The Government of Extremadura, (Fondos FEDER), PII-Acción VII-UEX 2010 and the Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

RERERENCES

1. Gardea-Torresday JL, Gomez E, Parsons JG, Peralta-Videa JR, Santiago P, Torresday KJ, Troiani HE, Yacaman MJ (2002) Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett* 2:397-401.
2. Zhao Y, Dai X, Blackwell HE, Schreiber SL, Chory J (2003) SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science* 301: 1107–1110.
3. Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N (1997) Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. *Biosci Biotechnol Biochem.*61:332-335.
4. Lam KC, Nickerson GB, Deinzer ML (1986) A rapid solvent-extraction method for hop essential oils. *J Agric Food Chem* 34:63-66
5. Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegeman G, De Keukeleire D, Heyerick A (2009) Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod* 72:1220-1230.
6. Zanolì P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L J *Ethnopharmacol* 116: 383-396.
7. Meissner O, Haberlein H, Influence of xanthohumol on the binding behaviour of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Planta Med.* 72, 656-658 (2006).
8. Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, Yoshinobu K (2006) Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J Agric Food Chem.* 54: 2514-1519.

9. Zanolì P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia R, Avallone R, Baraldi Mm (2007) Evidence the β -acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J. Ethnopharmacol* 109: 87-92.
10. Sánchez CL, Franco L, Bravo R, Rubio C, Rodríguez AB, Barriga C, Cubero J (2010). Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Rev Esp Nutr Comunitaria*. 16:160-163.
11. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez A, Barriga C, Cubero J (2012 a) The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiol Hung* 99:133–139 DOI: 10.1556/APhysiol.99.2012.2.6
12. Abourashed EA, Koetter U, Brattström A (2004) In vitro binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine*. 11 633-638.
13. Weeks BS (2009) Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian. *Med Sci Monit*. 15, 256-262, (2009).
14. Keeney A, Jessop D, Harbuz C, Marsden A, Hogg S, Blackburn-Munro E (2006) Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Strees on Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis Fuction and Hippocampal Serotonin Release in Mice. *Journal of Neuroendocrinoly* 18:330-338.
15. Gorinstein S, Zemser M, Vargas-Albores F, Ochoa JL, Paredes-López O et al. (1999) Proteins and amino acids in beer, their contents and relationships with other analytical data. *Food Chem* 67:71-78.
16. Miaomiao T, Zhang J, Amara M, Yingzi H, Liping G, Yang L (2014) Efficient capillary electrophoresis separation and determination of free amino acids in beer samples. *Electrophoresis* 35:577-584.
17. Ghosh S, Smriga M, Vuvor F, Suri D, Mohammed H, Armah SM, Scrimshaw (2010) Effect of lysine supplementation on health and morbidity in subject belonging to poor peri-urban households in Accra, Ghana. *Am J Clin Nutr* 92:928-939.
18. Smriga M, Torii K (2003) L-Lisine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proc Natl Acad Sci* 100:15370-15375.

19. Smriga M, Ghosh S, Mouneimne Y, Pellett PL, Scrimshaw NS (2004) Lysine fortification reduces anxiety and lessens stress in family members in economically weak communities in Northwest Syria. *Proc Natl Acad Sci* 101:8285-8288.
20. Franco L, Sánchez C, Bravo R, Rodríguez AB, Barriga C, Romero E, Cubero J (2012 b) The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses. *PloS One* 7:7 e37290 *PloS One*.
21. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE (2008) STAI Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo. *Publicaciones de Psicología Aplicada*. 7th ed. Madrid. TEA Publishers.
22. Kirby LG, Allen AR, Lucki I (1995) Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* 682: 189–196.
23. Kundrotas LV & Gregg RV (1977) Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the rat after immobilization stress. *Physiol Behav* 19:739-741.
24. Franco L, Bravo R, Sánchez C, Romero E, Rodríguez AB, Barriga C, Cubero J (2012 c). Análisis nutricional y hábitos alimentarios en personal sanitario con turnos rotatorios. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 18:200-204.
25. Franco L, Bravo R, Rodríguez AB, Barriga C, Cubero J (2014) Effect of non-alcoholic beer on Subjective Sleep Quality of a university stressed population. *Acta Physiol Hung*: In Press.
26. Charney DS, Wood SW, Krystal JH, Nagy LM, Heninger GR (1990) Hypothesis relating serotonergic dysfunction to the etiology and treatment of panic and generalized anxiety disorders. In: Coccaro EF and Murphy DL (Eds), *Serotonin in Major Psychiatric Disorders*. American Psychiatric Press. Washington DC: 127-152.
27. Kahn RS, Kalus O, Wetzler S, Praag HM (1991) The role of serotonin in the regulation of anxiety In: Brown S, Van Praag HM, (Eds) *The role of serotonin in Psychiatric Disorders*. Brunner/Mazel. New York 129-160.
28. Garvey MJ, Noyes R, Woodman C, Laukes C (1995) Relationships of generalized anxiety symptoms to urinary 5-hydroxyindoleacetic acid and vanillylmandelic acid. *Psychiat Res* 57:1-5.
29. Jezova D, Makatsori A, Smirga M, Morinaga Y, Duncko R (2005) Subchronic treatment with amino acid mixture of L-lysine and L-arginine modifies neuroendocrine activation during psychosocial stress in subject with high trait anxiety. *Nutr Neurosci* 8:155-160.

30. Lakhan SE, Vieira KF (2010) Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systemic review. *Nutrition J* 9:1-14.

Table 1: Anthropometric Characteristics of a population of students under exams stress.

Age (years)	20.09 ± 2.23
Weight (Kg)	67.80 ± 15.86
Height (m)	1.72 ± 0.11
BMI	23.13 ± 3.03

Each value represents the mean ± SD of participants. n=16.

Table 2. Influence of non-alcoholic beer consumption on Anxiety Levels of a population of students under exams stress.

	Control	Non-alcoholic Beer Treatment
Anxiety / State	24 ± 4.24	18.13 ± 2.9*

Each value represents the mean ± SD of participants. Participants completed both tests at 10.00 a.m. before the beginning of the trial (control score) and one day following its termination (14 days). Up to 10 min was allowed for completion of these paper and pencil surveys.

* p<0.05 respect to the Control. The results were analyzed by T-Student test comparing two groups. n=16.

Table3. Influence of non-alcoholic beer consumption on Neuromolecules Levels on cortisol, 6 sulfatoxymelatonin (aMT6-S) and 5-hidroxyindolacetic acid (5-HIAA) of a population of students under exams stress.

	Control	Non-alcoholic Beer Treatment
Cortisol	1.56 ± 1.10	1.53 ± 0.96
aMT6-S	98.11 ± 12.68	91.35 ± 15.89
5-HIAA	8.8 ± 0.5	5.55 ± 0.95*

Each value represents the mean ± SD of participants.

* p<0.05 respect to the Control. The results were analyzed by T-Student test comparing two groups. n=16.

4. Discusión General



La cerveza goza de una reconocida estima dentro de la dieta mediterránea. Desde estas últimas décadas se estudia la cerveza no solo desde un punto de vista puramente nutricional, sino ante la posibilidad de que sea considerada como alimento funcional, es decir, con propiedades para mejorar la salud (Rodríguez y cols., 1999; Roberfroid, 2000). Gracias a sus componentes, sus posibilidades preventivas son numerosas contra enfermedades óseas, circulatorias o frente a determinados tipos de cáncer.

El efecto del lúpulo en el sueño ha sido ampliamente confirmado en distintos experimentos tanto en modelo humano como en animal. Así, en la década de los 70, Bravo y cols., (1974) mostraron un descenso en la actividad motora en ratones después de la administración intraperitoneal de altas dosis de extracto de lúpulo. Lee y cols., (1993) comprobaron su efecto analgésico en ratones, apreciándose también en dicho estudio una mejora en la inducción del sueño.

Son numerosos los trabajos de investigación que apoyan el concepto de crononutrición. Es decir, debido a los componentes nutricionales de los alimentos, la hora de la ingesta de los mismos puede influir en la regulación de los ritmos circadianos. Así, cuando las personas tomaron en la cena un 27.85 g de cerezas, fruta rica en triptófano, serotonina y melatonina, se observó una mejor calidad en el ritmo del sueño (Garrido y cols., 2010; Garrido y cols., 2012). En la lactancia o en la senescencia, etapas en las que o bien no se han conseguido un ritmo adecuado o aparece una cronodisrupción, podemos encarrilar los ritmos sueño/vigilia con la toma de alimentos ricos en sustancias promotoras del sueño. En los recién nacidos que tomaron "*leches noches*" ricas en triptófano, adenosina, uridina y triglicéridos de cadena media, se apreciaron mejoras en sus ritmos del sueño nocturno, el cual se hizo en armonía con el entorno cambiante de luz/oscuridad (Cubero y cols., 2006a; Cubero y cols., 2006b; Cubero y cols., 2006c). Teniendo en cuenta que a partir de los 45 años empieza un descenso en los niveles de melatonina circulante, una de las causas principales de los problemas de sueño que aparecen en la madurez, la ingesta de cereales con triptófano provocó mejoras importantes en los individuos que lo consumieron por la noche, observándose una menor latencia del sueño y una mayor calidad del mismo (Bravo y cols., 2012).

Teniendo en cuenta que la cerveza contiene lúpulo y este posee el α -ácido 2-metil-3-butenol, el polifenol xantulmol, el terpeno mircenol, el aminoácido esencial lisina y pequeñas concentraciones de melatonina, nos propusimos en esta Tesis Doctoral abordar los beneficios que el consumo de una cerveza sin alcohol ingerida en la cena, pudiera tener sobre el ritmo del sueño y la ansiedad en personal sanitario en turnos rotatorios y estudiantes universitarios en periodo de exámenes. Elegimos a estas poblaciones de individuos porque ambas presentan un alto grado de estrés, hecho que desencadena una cronodisrupción en el ritmo sueño/vigilia.

En primer lugar quisimos realizar un estudio previo en animales, en los que se valoró si la ingesta del lúpulo que contiene la cerveza en si podría afectar a los ritmos de actividad/reposo. Se escogió a la especie aviar *Coturnix coturnix*, ya que la misma presenta actividad diurna y monofásica como los humanos. Dado que el peso medio de nuestros animales experimentales era 263.5 ± 17 g, las dosis administradas en los experimentos fue de 1, 2 y 11 mg de extracto de lúpulo por cápsula y por día, equivalentes en humanos a 3.80, 7.60 y 41.80 mg/kg de peso. Nuestros resultados mostraron que cuando los animales ingirieron capsulas de 2 u 11 mg, tuvieron un descenso en la actividad motora, valores que fueron obtenidos al apreciar una disminución del parámetro MESOR. Sin embargo, hay un inconveniente cuando los animales tomaron la dosis más alta, ya que el descenso en la actividad no ocurrió durante esa noche, apareciendo un descenso de la actividad en el periodo diurno del día siguiente, lo que se denomina desfase.

En nuestro tratamiento con los animales se aprecia un efecto dosis dependiente, es decir solo con la dosis adecuada de 2 mg, que corresponde a 7.60 mg/kg se produce un descenso en la actividad nocturna, sedación que es mantenida hasta el periodo diurno. Posiblemente sea la fracción de α -ácido amargo del lúpulo, tal como indica Zanolli y cols., (2007), la causa del sueño durante la noche en nuestros animales. De hecho, con concentraciones de extracto de lúpulo de 10 mg/kg equivalente a 2 mg por animal (en este caso ratones) se consiguió una reducción en la actividad locomotora espontánea por animal (Zanolli y cols., 2005). Es decir, tanto en nuestros experimentos en animales diurnos, como los llevados a cabo con mamíferos nocturnos, y utilizando las mismas dosis, se obtuvieron resultados consistentes el uno

con el otro (Dimpfel y Suter, 2008). Una concentración sustancialmente mayor de extracto de lúpulo administrado junto a anestésicos e hipnóticos, como la ketamina, condujeron a prolongados estados de narcosis profunda (Vonderheid-Guth y cols., 2000). De manera similar, el producto de la degradación oxidativa del contenido α -ácido del lúpulo fresco, 2-methyl-3-buten-2-ol, aplicado a ratones en concentraciones de 0.8 g/kg produjeron narcosis que duró 8 horas (Hänsel y cols., 1980).

A continuación quisimos valorar en una población de personal sanitario de turno rotatorio sometido al estrés, si la ingesta de una cerveza sin alcohol durante la cena y en un periodo de 14 días, podría influir en la calidad del sueño nocturno. Nuestros resultados, llevados a cabo mediante activimetría, mostraron que a pesar de que no hubo incremento del tiempo de reposo en cama, sí apareció una clara mejoría en la calidad del sueño tras la ingestión de una cerveza al final del día, apreciándose una reducción de la latencia del sueño y de la movilidad nocturna. Por tanto, podemos apuntar el hecho de que la ingesta de cerveza sin alcohol supone una herramienta óptima nutricional favorecedora del sueño nocturno, ya que sus componentes neuromoduladores pueden ayudar a encarrilar el ritmo sueño/vigilia (Cubero y cols., 2009).

El mecanismo por el cual la cerveza actúa sobre el sueño radica en la modulación de la respuesta GABAérgica llevado a cabo por el lúpulo que posee el α -ácido 2-metil-3-butenol, el polifenol xantulmol, el terpeno mircenol, el aminoácido esencial lisina y pequeñas concentraciones de melatonina (Meissner y Haberlein, 2006). De hecho, la propiedad sedante del lúpulo ha sido confirmada en humanos cuando se administró en combinación con la valeriana (*Valeriana officinalis*), actuando ambas sustancias de forma sinérgica en la función sedante (Zanoli y cols., 2007, Dimpfel y Suter, 2008, Figard y cols., 2008; Magalhaes y cols., 2009; Romero y cols., 2007c). Otros estudios llevados a cabo por Schellenberg y cols., (2004), observando el efecto combinado del lúpulo y la valeriana sobre el mecanismo central de adenosina en el efecto inductor del sueño, mostraron un incremento en las ondas alfa en el EGG, efecto que fue cuantificado a través de los receptores de adenosina. A esta acción del lúpulo sobre la adenosina (Zanoli y Zavati, 2008) en la inducción del sueño, debemos añadir también el efecto en el SNC de la hormona melatonina presente en la cerveza

(Morin y col., 2005; Maldonado y cols., 2009), la cual es la señal reguladora de los ritmos del sueño.

En el personal sanitario de turnos rotatorios se observa que la antigüedad en el mismo, se correlaciona positivamente con porcentaje de grasa corporal ($r=0,454$ $p<0,05$) y negativamente con la masa libre de grasa ($r=-0,454$ $p<0,05$) sugiriendo este hecho un efecto negativo sobre el sueño debido al incremento en la masa corporal (Ruíz y cols., 2010). En nuestro trabajo hemos podido observar cómo las personas sometidas a turnos rotatorios ingieren mayor cantidad de calorías que las necesarias, ya que el consumo de lípidos y proteínas se incrementa por encima de las raciones diarias recomendadas. En cambio, esta población consume menor cantidad de hidratos de carbono que las aconsejadas. Esto es debido a que la restricción de sueño provoca la desregulación del apetito (Taheri y cols., 2004), lo cual conlleva a cambios hormonales como una disminución de leptina, hormona que actúa inhibiendo el hambre a nivel hipotalámico. Así mismo, esta situación provoca un aumento de ghrelina, cuya función es estimular a neuronas hipotalámicas que ocasionan aumento del apetito (Taheri y cols., 2004; Copinschi, 2005). Señalar que el consumo de una cerveza sin alcohol diaria no tiene porque influir en el aumento de peso corporal, ya que es una bebida de baja graduación alcohólica (4° - 5°), no contiene grasas, su aporte calórico es moderado (45 kcal/100 ml), conteniendo numerosas vitaminas hidrosolubles, fibra y minerales aunque con baja concentración de sodio.

Los hábitos alimentarios de las trabajadoras nocturnas sufren alteraciones en la calidad, cantidad y ritmo de las comidas (mayor consumo de bocadillos, bebidas gaseosas y alcohólicas, snacks, dulces y cafeína), como hemos podido observar en nuestro estudio. De hecho, la dieta no es balanceada ya que el porcentaje idóneo de 50% hidratos de carbono, 35% lípidos y 15% proteínas difiere mucho del consumo real de las voluntarias, constatado en una disminución de las raciones del grupo 1 (Cereales, patatas, azúcar) y un aumento de las raciones de los grupos 2 (Lípidos, mantequillas, aceites y grasas en general), 3 (Lácteos) y 4 (Cárnicos, huevos y pescados).

Todo lo mencionado está unido a un mayor consumo de nicotina y estimulantes para combatir el sueño. Aunque el número de publicaciones que hemos encontrado sobre el tema es escaso, en todos ellos se habla de un incremento de la ingesta total de energía que podría llevar al sobrepeso. El horario habitual de las comidas se modifica, son más rápidas, frías, e incluso se prescinde de alguna toma. Estos hábitos conllevan a alteraciones digestivas que desencadenan patologías tales como: dispepsia, gastritis, digestiones pesadas, flatulencia, úlcera de estómago y aumento de peso. Todo ello, unido al cansancio que aparece por la falta de sueño, hace que la actividad física se vuelva fatigosa. Es decir, se aumenta la ingesta de alimentos y se disminuye el gasto energético, lo que conlleva a un incremento progresivo del peso corporal (García-López, 2003; Bonet-Porqueras y cols., 2009; Fernández-Rodríguez y cols., 2004).

En cuanto a los macro y micronutrientes destacar que el consumo de la vitamina C, vitamina K, niacina y vitamina B12, así como el de las sales minerales cobre, fósforo, cloro y sodio, fue igual o superior al doble de lo recomendado. Por tanto, se puede alterar el balance hídrico, principalmente el sodio como electrolito, causando hipertensión arterial en la población sometida a turno rotatorio. Finalmente, y a modo de resumen, en cuanto a las deficiencias más destacadas en la dieta diaria indicar la de los hidratos de carbono, y respecto a los micronutrientes las de: flúor, ácido fólico, potasio, iodo, hierro, zinc y magnesio, pero especialmente las de la vitamina D y calcio, siendo el consumo de estas dos últimas menor de las Cantidades Diarias Recomendadas, lo que puede incidir en un factor de riesgo para la osteoporosis.

Los componentes de la cerveza son importantes en la lucha frente a los radicales libres. Así, el lúpulo se ha empleado para tratar una variedad de procesos patológicos provocados por un alto estrés oxidativo, como son frente a las enfermedades de reumatismo, inflamación y trastornos de la menopausia (Zanoli y Zavatti, 2008). El polifenol xantumol, presente en la cerveza, previene el daño hepático agudo provocado por el carbón tetrachloride (CCl₄) en ratas (Pinto y cols., 2012), hecho que pueden ser atribuidos a sus propiedades antioxidantes, bien por sus propias capacidades reductoras o bien por sus posibles influencias sobre su estado intracelular

redox (Angeloni y cols., 2012). Una de las funciones que se llevan a cabo durante el sueño es la neutralización de los radicales libres producidos en los procesos metabólicos llevados a cabo en nuestra actividad diaria. Los trabajadores a turnos que no pueden dormir por la noche, acumulan un exceso de radicales libres. Por tanto, la toma de una cerveza sin alcohol en la cena es muy recomendable en este grupo poblacional, ya que sin poder conciliar el sueño durante la noche nos encontramos más desprotegidos frente al ataque de los radicales. Nuestros resultados obtenidos respecto a la capacidad antioxidante, medido en orina, del personal sanitario tras tomar cerveza, indican que la misma se encuentra incrementada con respecto a los valores obtenidos en sus propios controles (antes de comenzar el estudio). Por esta razón recomendamos la ingestión de cerveza sin alcohol en la población sanitaria sometida a turnos rotatorios

Estos resultados coinciden con los estudios llevados a cabo por Pinto y cols., (2012) y Rodríguez y cols., (2001), en los cuales atribuyen el efecto antioxidante de la cerveza a los polifenoles contenidos en la misma. Además, Codoñer-Franch y cols., (2012) y Arnao y cols., (2001) indican que si se incrementa el periodo de administración de la cerveza, o la concentración en lúpulo de la misma, se consigue una elevación de la capacidad antioxidante total. Señalar la capacidad antimicrobiana de los polifenoles, debido al ácido gálico, el cual representa un mecanismo de defensa natural en muchas frutas contra el desarrollo de enfermedades microbianas y fúngicas (Chung y Stevens, 1993). Indicar, finalmente, que hay otros alimentos que por sus componentes son capaces de incrementar también la respuesta antioxidante tras su consumo. Así, Garrido y cols., (2010) y Bravo y cols., (2012) usando durante la cena cerezas y cereales enriquecidos con triptófano, observaron un aumento de la respuesta antioxidante en la orina de las personas que participaron en los estudios.

Factores académicos y personales también pueden precipitar la privación del sueño e incrementar la somnolencia diurna. Así, Marín y cols., (2005) han mostrado que en una población universitaria en época de exámenes, la cantidad y calidad del sueño disminuyen como resultado del incremento de las demandas del entorno y psicológicas del estudiante (Carskadon, 1990). Teniendo en cuenta que habíamos trabajado con personal sanitario de turno rotatorio sometido a estrés, quisimos

centrarnos en el estudio de la cerveza en una población de estudiantes universitarios sometidos al estrés de los exámenes en convocatoria oficial, y valorar en los mismos los parámetros del sueño nocturno mediante Activimetría, la ansiedad, la calidad subjetiva del sueño y los neuromediadores y hormonas que intervienen en el ritmo sueño/vigilia. Para ello, contamos un grupo de 31 estudiantes universitarios en el periodo de exámenes oficiales que tomaron una cerveza sin alcohol en la cena durante catorce días. A los mismos también se les analizaron los parámetros de Activimetría, además del cuestionario de ansiedad Estado/Rasgo (STAI), les realizo el test de calidad subjetiva del sueño (test de Pittsburg), y se les tomaron muestras de orina para valorar en las mismas el nivel de cortisol y los metabolitos de excreción de la melatonina y de la serotonina.

La calidad del sueño por Activimetría y la puntuación global subjetiva realizada a los estudiantes universitarios mostró una mejora del sueño bebiendo una cerveza sin alcohol durante la cena. Este hecho representa una clara ventaja, ya que esta población durante los exámenes presenta una pérdida de sueño, lo que conlleva a un efecto negativo en la vigilia, memoria, lenguaje, resultados cognitivos y académicos (Arnedt y cols., 2005; Bonnet, 1985; Curcio y cols., 2006; Philibert, 2005; Rodrigues y cols., 2002). De hecho, otras investigaciones han mostrado que la privación del sueño afecta negativamente a las funciones ejecutoras como la habilidad de tomar decisiones (Killgore y cols., 2006), integrar emociones o la cognición para guiar juicios morales (Killgore y cols., 2007).

Señalar que en nuestro estudio se utilizó el test de Pittsburg, el cual presenta algunas limitaciones. Una de ellas es que los cuestionarios eran auto administrados, basado en el juicio subjetivo de las personas que participaron en la investigación. Debido a esto, la información recogida puede tener distorsiones de memoria. Dado que la medida que la calidad del sueño y de la vigilia eran variables subjetivas, ellos podrían subestimarlas o sobreestimarlas (García López y cols., 2000., Wiggins y cols., 1990). Aclarar los resultados obtenidos en los estudiantes usando el test de Pittsburg, coinciden con los mostrados por Activimetría y además von los anteriores de la población sanitaria. en la población sanitaria anteriormente en la población sanitaria en las que se emplearon actiwatch para medir el ritmo del sueño/vigilia tras la toma de

cerveza en la cena. Es decir, los resultados obtenidos por activimetría respalda la valoración de la calidad subjetiva del sueño evaluada por el test Pittsburg.

Con respecto a la medición en orina del metabolito de excreción de la hormona melatonina, 6-sulfatoximelatonina, tras la toma de una cerveza sin alcohol en la población de estudiantes, no aparecieron cambios con respecto al valor obtenido antes de su consumo. Este hecho refleja que los valores de melatonina en cerveza (Maldonado y cols., 2009) no son lo suficientemente altos como para ser detectados en orina tras su consumo.

Cuando los alumnos realizaron el cuestionario de ansiedad STAI, se apreció una disminución en la ansiedad/estado después de consumir durante 14 días una cerveza sin alcohol en la cena, como se indicó anteriormente. Sin embargo, cuando se cuantificó en orina el nivel de cortisol, aunque estos bajaron al final del tratamiento, no aparecieron cambios significativos. En cuanto a la Neurotransmisión Serotoninérgica a nivel periférico, se ha demostrado un incremento de su metabolito de excreción, 5-HIAA, tanto en un modelo animal sometido a estrés (Kundrotas y Gregg, 1977), como en la orina de pacientes que presentaban altos niveles de ansiedad (Garvey y cols., 1995). Las concentraciones de 5-HIAA detectadas en orina, son un reflejo directo de la serotonina circulante, la cual es producida principalmente por las células enterocromafines del intestino (Gershon, 2013; Kundrotas y Gregg, 1977). En los estados de ansiedad se incrementan los valores de serotonina en el intestino, siendo este neuromediador responsable de desencadenar los trastornos gastrointestinales que se presentan en situaciones de ansiedad, dando un cuadro característico de vómitos, pérdida de peso, diarreas o dolores abdominales entre otras patologías (Kundrotas y Gregg, 1977). Al analizar nuestros resultados en los alumnos universitarios que ingirieron una cerveza sin alcohol en la cena, observamos que los niveles de 5-HIAA se encontraban disminuidos tras 14 días de la ingesta dicha bebida, es decir habíamos conseguido bajar los niveles de serotonina que en situaciones de estrés se incrementan (Kundrotas y Gregg, 1977; Garvey y cols., 1995). Este hecho puede ser debido a que la cerveza contiene el aminoácido esencial lisina (Gorinstein y cols., 1999), el cual es capaz de bloquear los receptores 5HT4 del TGI motivo por el cual disminuyen los valores de este metabolito en orina tal como reflejan nuestros

resultados. Además, la lisina bloquea a los receptores 5-HT4 presentes en el intestino impidiendo que la serotonina realice en este lugar su función. Todo ello, unido a la acción sedante del lúpulo, hace que podamos sugerir que la cerveza sin alcohol puede ayudar a disminuir la ansiedad y los trastornos gastrointestinales que aparecen en situaciones de estrés.

La pérdida de sueño también tiene otras consecuencias conocidas en la salud mental, como cambios de humor, depresión, estrés y ansiedad (Bellini y cols., 2002; Killgore y cols., 2007; Smith-Coggins y cols., 1994) lo que conlleva al abuso de sustancias narcóticas (Hsu Wen y cols., 2012). Un mal descanso durante la noche repercute en la vida familiar y social ya que provoca efectos negativos en las relaciones personales, así como un descenso del tiempo pasado con la familia (García López y cols., 2000). A la vista de nuestros resultados podemos aconsejar ingerir cerveza sin alcohol durante la cena ya que su actividad sedante produce mejora en el sueño nocturno. Este hecho es recomendado especialmente en poblaciones bajo estrés, como el personal sanitario a turno rotatorio o los estudiantes universitarios durante el periodo de exámenes. Un buen sueño de calidad tiene no solo que ver con dormir bien de noche, sino también con el buen desempeño de las actividades diurnas (Marín y cols., 2005).

5. Conclusiones



De los resultados obtenidos en la presente Tesis, en la que nos proponíamos evaluar los beneficios de la cerveza sin alcohol en el ritmo actividad/reposo de animales diurnos (*Coturnix coturnix*) y en el ritmo sueño/vigilia y estado de ánimo en dos grupos de personas sometidas a estrés: Personal Sanitario del Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina (SES) y Estudiantes Universitarios (UEX) en periodo de exámenes oficiales, podemos concluir que:

1. En las codornices se pone de manifiesto el efecto sedante del lúpulo, ya que al ingerir estos animales cápsulas con 2 mg se produce una disminución en los pulsos de actividad motora durante el periodo nocturno.
2. En los registros de activimetría llevados a cabo en el personal sanitario con turnos rotatorios y sometidos a estrés, se aprecia que la ingesta de una cerveza sin alcohol en la cena produce una mayor calidad del sueño, al disminuir la latencia del sueño y la actividad total.
3. El análisis nutricional y hábitos alimentarios de la población de profesionales sanitarias con turnos rotatorios y sometidos a estrés, nos indican que dicha población consume una dieta no equilibrada, con un bajo aporte en Hidratos de carbono y Calcio, así como una alta cantidad de Sodio.
4. El consumo de cerveza sin alcohol durante la cena en personal sanitario con turnos rotatorios y sometidos a estrés, provoca un aumento de la capacidad antioxidante en orina.
5. Al analizar la activimetría y cuestionario de calidad subjetiva de sueño de Pittsburgh en estudiantes universitarios bajo el estrés producido por exámenes oficiales, se aprecia una disminución en el tiempo de latencia así como una mejora en la calidad global del sueño.

6. Cuando los alumnos realizan el cuestionario de ansiedad STAI, se aprecia una disminución de la ansiedad estado después de consumir durante 14 días una cerveza sin alcohol en la cena, aunque los alumnos continúen sometidos al estrés de los exámenes.
7. Cuando se llevó a cabo la medición del metabolito de excreción en orina de la serotonina 14 días después de estar sometidos los alumnos al estrés de los exámenes y tras la toma de una cerveza sin alcohol en la cena, se aprecia un descenso circulante en este neuromediador.

CONCLUSION GENERAL

El lúpulo, componente de la cerveza, produce actividad sedante en *Coturnix coturnix*, así como la cerveza sin alcohol consumida en la cena provoca una mejora en la calidad del sueño y en la capacidad antioxidante en personal sanitario y estudiantes universitarios sometidos a estrés. Todo ello, unido a que la ansiedad disminuye tras la ingesta de esta bebida, se recomienda el consumo de cerveza sin alcohol por sus efectos beneficiosos para la salud.

5. Conclusion



The present findings obtained in this Doctoral Dissertation show the evaluation of the benefits of non-alcoholic beer on work/rest rhythm in diurnal animals (*Coturnix coturnix*) and sleep/wake rhythm and mood in two groups of people under stress: nurse staffing from Infanta Cristina University Hospital (SES) and students at the University of Extremadura (UEX) during official exams period. In conclusion, we can state that:

1. A sedative effect and decreases in activity motor pulses during nighttime are produced when supplementing 2 mg of hops once a day in quails.
2. Actimetry records from nursing personnel with rotating shifts and under stress show that consumption of a non-alcoholic beer at dinner produces a higher sleep quality by reducing sleep latency and total activity.
3. Nutritional analysis and evaluation of the eating habits of the nursing staff with rotating shifts under stress indicate that this population consumes an unbalanced diet: low-carbohydrate and calcium intake and high sodium content.
4. The consumption of non-alcoholic beer during dinner in nurse staffing with rotating shifts under stress causes an increase of antioxidant capacity in urine.
5. Actimetry and Pittsburgh's subjective quality sleep test in under-graduate students during official exams show a decrease in latency as well as an improvement in global sleep quality.
6. Data from the STAI anxiety test in under-graduate students show a decrease in anxiety after a 14-day consumption of a non-alcoholic beer at dinner, although the students remain under the stress of the exams.

7. After 14 days under the stress of the exams, and after consuming a non-alcoholic beer in dinner, a circulating decrease in serotonin from a urine metabolite of excretion was observed.

GENERAL CONCLUSION

Hop as a beer component, produces sedative effects in *Coturnix coturnix*, similar to those elicited by the consumption of non-alcoholic beer at dinner which cause an improvement on sleep quality and antioxidant capacity in nurse staffing and students under stress. All the above-mentioned benefits in addition to a decrease in anxiety lead consumption of non-alcoholic beer to be considered advantageous due to its valuable effects in health.

6. Bibliografía



Abe M., Reiter R.J., Orhii P.B., Hara M., Poeggeler B. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin. *J. Pineal Res.* 1994, 17: 94-100.

Acuña-Castroviejo D., Escames G., León J., Carazo A., Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 527: 549-557.

Agunbiade F.O., Olu-Owolabi B.I., Adebowale K.O. Phytoremediation potential of *Eichornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 4521-4526.

Ahlman H., Bhargava H.N., Dahlstrom A., Larsson I., Newson B., Petterson G. On the presence of serotonin in the gut lumen and possible release mechanisms. *Acta. Physiol.Scand.* 1981; 112: 263-269.

Aimoto T., Rohde B.H., Chiou G.C., Lauber J.K. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J. Ocul. Pharmacol.* 1985, 1: 149-160.

Airaskinen M.M., Miettinen T.A., Huttunen J. glucuronidation of 5-hydroxyindol derivatives in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 1965, 14: 1019-1023.

Aldegunde M. El sistema serotoninérgico cerebral en vertebrados e invertebrados. *Rev. R.Acad. Galega Cienc.* 1998; 17: 121-172.

Allen G.F.G., Land J.M., Heales S.J.R. A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2009, 97: 6- 14.

Alonso R. La glándula pineal. En: Fisiología Humana. Tresguerres J.A.F., ed. McGraw-Hill-Interamericana. 1999, 894-901.

Ángeles-Castellanos M., Rodríguez K., Salgado R., Escobar C. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. Monografía. Rev Fac Med UNAM Vol.50 No.6 Noviembre-Diciembre, 2007.

Angeloni C., Pirola L., Vauzour D., Maraldi T. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2014, Article ID 576363, 3 pages.

Antolín I., Rodríguez C., Sainz R.M., Mayo J.C., Uría H., Kotler M.L., Rodríguez-Colunga M.J., Tolvía D., Menéndez-Peláez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. FASEB J. 1996, 10: 882-890.

Aoshima H., Takeda K., Okita Y., Sheikh Julfikar H., Koda H. Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. J Agric Food Chem. 2006; 54:2514-9.

Arendt J., Skene D.J. Melatonin as a chronobiotic. Sleep Med. Rev. 2005, 9: 25-39.

Arnao M.B., Cano A., Alcolea J.F., Acosta M. Stimulation of free radicalquenching activity of leaf pigment extract. Phytochem Anal 2001; 12:138-143.

Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. J. Pineal Res. 2009, 46: 295-299.

- Arnedt J.T., Owens J., Crouch M., Stahl J., Carskadon M.A.** Neurobehavioral performance of residents after heavy night call vs after alcohol ingestion. *JAMA*. 2005; 294, 1025-1033.
- Aserinsky E., Kleitman N.** Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 1953; 118: 273-274.
- Ashton H.** Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* 1994; 48: 25-40.
- Ayala-Guerrero F., Mexicano G.** Filogenia del sueño: de invertebrados a vertebrados. *Rev Med UV* 2008; Sup 2 8(1): 37-45.
- Bailey L.G., Ward M., Musa M.N.** Clinical pharmacokinetics of benzodiazepines. *J Clin Pharmacol* 1994; 34:384-11.
- Balm P.H., Pepels P., Helfrich S., Hovens M.L., Bonga S.E.** Adrenocorticotrophic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen Comp Endocrinol*. 1994 Dec;96(3):347-60.
- Barlow-Walden L.R., Reiter R. J., Abe M., Pablos M., Menéndez-Peláez A., Chen L.D., Poeggeler B.** Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int*. 1995; 26: 497-502.
- Barriga C., Cubero J., Narciso D., Paredes S.D., Sánchez S., Terrón M.P., Rodríguez A.B.** Ritmos biológicos en hematología e inmunología. *Cronobiología básica y clínica*. 2006; 6573-595.

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. *Biogen Amin* 2004; 18(3-6) pp 147-176

Barriga C., Rodríguez A.B., Esteban S., Rial R.V. Interrelations between sleep and the immune status. *Rev. Neurol.* 2005, 40: 548-556.

Baumel S. Serotonin. McGraw-Hill Professional. 1999.

Bechtholt A.J., Hill T.E., Lucki I. Anxiolytic effect of serotonin depletion in the novelty-induced hypophagia test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 190: 531-540.

Bejarano-Romero F., Piñol-Moreso J.L., Mora-Gilabert N., Claver-Luqye P., Brull-López N., Basora-Gallisa J. Elevado consumo de benzodiazepinas en mujeres ancianas asignadas a centros de salud urbanos de atención primaria. *Aten Primaria* 2008; 40(12):617-21.

Bellini L.M., Baime M., Shea J.A. Variation of mood and empathy during internship. *JAMA*. 2002; 287, 3143-3146.

Bell-Pedersen D., Cassone V.M., Earnest D.J., Golden S.S., Hardin P.E., Thomas T.L., Zoran M.J. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics*. 2005; 6: 544-556.

Berger H. Über das Elektroenkephalogramm des Menschen. *J Psychol Neurol* 1930; 40: 160-179.

Berger J. Regulation of circadian rhythms. *J. Appl. Biomed.* 2004; 2: 131-140.

Berger M., Gray J.A., Roth B.L. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 2009, 60: 355-366.

Bernardo M., Labrador-Encinas F.J. Evaluación del estrés laboral y burnout en los servicios de urgencia extrahospitalaria. *Int J Clin Health Psychol*, 2006 Vol. 7, Nº 2. pp. 323-335

Biello S.M. Circadian clock resetting in the mouse changes with age. *Age (Dordr)*. 2009; 31: 293-303.

Bliwise D.L. Normal aging. In Kryger MH, Roth T, Dement WD, eds. *Principles and practice of sleep medicine*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994. p. 26-39.

Bonet-Porqueras R., Moliné Pallarés A., Olona Cabases M., Gil Mateu E., Bonet Notario P., Les Morell E., Iza-Maizaf M. Turno nocturno: un factor de riesgo en la salud y calidad de vida del personal de enfermería. *Enferm Clin.* 2009; 19:76–82.

Bonnefont-Rousselot D., Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*. 2010, 278: 55-67.

Bonnet M.H. Effect of sleep disruption on sleep, performance, and mood. *Sleep*. 1985; 8,11-19.

Borbély A.A. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In Kryger MH, Roth T, Dement WD, eds. *Principles and practice of sleep medicine*. 2 ed. Philadelphia:W.B. Saunders; 1994. p. 309-20.

Botey A. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Su utilidad clínica. *Endocrinol Nutr.* 2006; 53(4):270-8.

- Boullosa O., López-Mato A., Cetkovich B., Ciprian-Olliver J.** Actualización en serotonina. *Alcmeon. Neuropsiquiatría* 1992 2(3) pp 327-36
- Bourin P., Mansour I., Doinel C., Roue R., Rouger P., Levi F.** Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. *Chronobiol. Int.* 1993; 10: 298-305.
- Boutin J.A., Audinot V., Ferry G., Delagrangre P.** Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005, 26: 412-419.
- Bravo L., Cabo J., Fraile A., Jimenez J., Villar A.** Estudio farmacodinámico del lúpulo (*Humulus lupulus L.*). Acción tranquilizante. *Boll Chim Farm* 1974; 113: 310–315.
- Bravo R., Matito S., Cubero J., Paredes S.D., Franco L., Rivero M., Rodríguez A.B., Barriga C.** Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans. *AGE.* 2012; 7(7):e37290
- Bremer F.** Cerveau "isolé" et physiologie du sommeil. *C.R. Soc. Biol.* 1935; 118: 1235-1241.
- British National Formulary.** Nº 30. British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 1995:147-55,204-7.
- Buijs R.M., Kreier F.** The metabolic syndrome: a brain disease? *J Endocrinol.* 2006 18:715-6.
- Cagnacci A.** Influences of melatonin on human circadian rhythms. *Chronobiol.Int.* 1997; 14: 205-220.

- Cagnoli C.M., Atabay C., Kharlamova E., Manev H.** Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 1995, 18: 222-226.
- Cai A., Wise P.M.** Age-related changes in the diurnal rhythm of CRH gene expression in the paraventricular nuclei. *Am.J. Physiol.* 1996; 270(2): 238-243.
- Cambras Riu, T.** Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. En: *Cronobiología básica y clínica* (Eds.: J.A. Madrid y M.A. Rol de Lama). Editec@Red, Madrid, España. 2006; Cap. 4 pp 151-189.
- Cambras T.** Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. En: *Cronobiología básica y clínica*. Madrid J.A. y Rol de Lama M.A., eds. Editec@Red. 2006, 151-189.
- Camilleri M., Von der Ohe M.R.** Drugs affecting serotonin receptors. *Baillieres Clin.Gastroenterol.* 1994; 8: 301-319.
- Caminero-Rodríguez A.B., Pareja J.A.** Bases anatómicas y neuroquímicas que explican la frecuente asociación de las cefaleas con el sueño: el paradigma de la cefalea hípica. *REV NEUROL* 2008; 47 (6): 314-320
- Caniato R., Filippini R., Piovan A., Puricelli L., Borsarini A., Cappelletti E.M.** Melatonin in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 527: 593-597.
- Cano P., Cardinali D.P., Chacón F., Castrillón P.O., Reyes Toso C.A., Esquifino A.I.** Age-dependent changes in 24-hour rhythms of catecholamine content and turnover in hypothalamus, corpus striatum and pituitary gland of rats injected with Freund's adjuvant. *BMC Physiol.* 2001, 1: 1-14.

Cardinali D.P., Brusco L.I., García-Bonacho M., Esquifino A.I. Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. *Neuroendocrinology*. 1998a. 67: 349-362.

Cardinali D.P., Brusco L.I., Selgas L., Esquifino A.I. Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats during Freund's adjuvant-induced arthritis. *Brain Res*. 1998b; 13; 789(2): 283-92.

Cardinali D.P., Cutrera R., Castrillón P.O., Esquifino A.I. Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis of rat submaxillary lymph nodes: effect of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy and melatonin replacement. *Neuroimmunomodulation*; 1996a. 3: 102-111.

Cardinali D.P., Della Maggiore V., Selgas L., Esquifino A.I. Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and noradrenergic and cholinergic markers in rat submaxillary lymph nodes. *Brain Research*; 1996b. 711:153-162.

Cardinali D.P., Golombek D.A. The rhythmic GABAergic system. *Neurochemical Research*. 1998a. 23: 611-618.

Cardinali D.P., Jordá Catalá J.J., Sánchez Barceló E.J. Introducción a la cronobiología. Servicio de publicaciones Universidad de Cantabria. 1994.

Carlotto M.S., Camara S.G., Brazil A.M. Predictores del síndrome de Burnout en estudiantes de un curso técnico de enfermería. *Perspectivas en Psicología*, 2005; 1, 195- 205.

- Carmona R., Bicho C.** Serao as Benzodiazepinas a Panacea para Todos os Males dos Portugueses? Boletim de Farmacovigilancia 2001 Infarmed; 5: 2-3.
- Carskadon M.A.** Patterns of sleep and sleepiness in adolescents. *Pediatrician*. 1990; 17, 5-12.
- Carskadon M.A., Dement W.C.** Normal human sleep: an overview. In Kryger MH, Roth T, Dement WD, eds. *Principles and practice of sleep medicine*. 2 ed. Philadelphia:W.B. Saunders; 1994. p. 16-25.
- Casanueva F., Apud J.A., Massoto C., Cocchi D., Locatelli V., Racagni G., Muller E.** Daily fluctuations in the activity of the tuberoinfundibular GABAergic system and plasma prolactin levels. *Neuroendocrinology*. 1984; 39(4): 367-370.
- Caspi O.** Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Altern. Ther. Health Med*. 2004; 10: 74-78.
- Cassone V.M., Natesan A.K.** Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms*. 1997; 12:489-497.
- Castrillón P.O., Esquifino A.I., Varas A., Zapata A., Cutrera R.A., Cardinali D.P.** Effect of melatonin on 24 hour rhythms in lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes. *J. Neuroendocrinology*. 2000; 12: 758-765.
- Celis J., Bustamante M., Cabrera D., Cabrera M., Alarcón,W., Monge, E.** Ansiedad y estrés académico en estudiantes de medicina humana de primer y sexto año. *Revista Anales de la Facultad de Medicina*, 2001; 62, 25-30.
- Chen G., Huo Y., Tan D.X., Liang Z., Zhang W., Zhang Y.** Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci*. 2003, 73: 19-26.

Cherniss, C. Professional burnout in human service organizations. Nueva York: Praeger, 1980.

Chung K.T., Stevens S.E. Environ. Toxicol. Chem. 1993, 12: 2121-2132.

Claparède E. Esquisse d'une théorie biologique du sommeil. Arch Psychol 1905; 4: 246-349.

Coates M.D., Mahoney C.R., Linden D.R., Sampson J.E., Chen J., Blaszyk H., Crowell M.D., Sharkey K.A., Gershon M.D., Mawe G.M., Moses P.L. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2004; 126: 1657-1664.

Codoñer-Franch P., Hernández-Aguilar M.T., Navarro-Ruiz A., López-Jaén A.B., Borja-Herrero C., Valls-Bellés V. Diet Supplementation During Early Lactation with Non-alcoholic Beer Increases the Antioxidant Properties of Breastmilk and Decreases the Oxidative Damage in Breastfeeding Mothers. Breastfeed Med 2012.

Cogburn L.A., Wilson-Placentra S., Letcher L.R. Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 1987, 68: 343-356.

Collin J.P., Voisin P., Falcon J., Faure J. P., Brisson P., Defaye J.R. Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. Arch Histol Cytol. 1989; 52 Suppl: 441-449.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 1995. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1180-1202.

Conti A., Conconi S., Hertens E., Skwarlo-Sonta K., Markowska M., Maestroni J. M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J.Pineal Res.* 2000, 28: 193-202.

Copinschi G. Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essent Psychopharmacol.* 2005; 6(6):341-7.

Copinschi G., Van Reeth O., Van Cauter E. Biologic rhythms. Effect of aging on the desynchronization of endogenous rhythmicity and environmental conditions. *Presse Med.* 1999, 28: 942-946.

Córdova-Castañeda A., Esquinca-Ramos J.L. Cronobiología. Ritmos biológicos. En: *Psiquiatría-3 Programa de Actualización Continua en Psiquiatría.* Intersistemas. 2001.

Crespo E., Macías M., Pozo D., Escames G., Martín M., Vives F., Guerrero J.M., Acuña-Castroviejo D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999, 13: 1537-1546.

Cubero J., Chanclón B., Sánchez S., Rivero M., Rodríguez A.B. Improving the quality of infant sleep through the inclusion at supper of cereals enriched with tryptophan, adenosine-59-phosphate, and uridine-59-phosphate. *Nutr Neurosci* 2009; 12: 272–80.

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. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2006c; 27: 373-380.

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. *Biogenics Amines.* 2006b; 20: 41-52.

Cubero J., Narciso D., Terrón M.P., Rial R., Esteban S., Rivero M., Rodríguez A.B., Barriga C. Chrononutrition applied to formula milks to consolidate infants sleep/wake cycle. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2007; 28: 360-366.

Cubero J., Ojalora B.B., Bravo R., Sánchez C.L., Franco L., Ugüz C., Rodríguez A.B., Barriga B. Distribution of 5-HT receptors in the mammalian brain. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 2011; Vol. 6.

Cubero J., Rodríguez A.B., Narciso D., Valero V., Paredes S., Sánchez J., Barriga C. Anotaciones básicas sobre el aminoácido triptófano. *Enfermería Global.* 2006a; 8: 1-6.

Curcio G., Ferrara M., De Gennaro L. Sleep loss, learning capacity and academic performance. *Sleep Med. Rev.* 2006; 10, 323-337.

De La Roza C., Reinoso-Suarez F. Ultrastructural synaptic organization of axon terminals in the ventral part of the cat oral pontine reticular nucleus. *J Comp Neurol* 2000; 427: 31-53.

- De Montigny C., Blier P.** Electrophysiological aspects of serotonin neuropharmacology: implications for antidepressant treatments. En: Neuropharmacology of serotonin. Green A. R. (ed.). Oxford University Press. 1985; pp. 181-195.
- 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* 2012, 10: 109–117.
- Dellegar S.M., Murphy S.A., Bourne A.E., Dicesare J.C., Purser G.H.** Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257: 431-439.
- Dement W., Kleitman N.** Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1957; 9: 673-690.
- Dement W., Wolpert E.A.** The relation of eye movements, body motility, and external stimuli to dream content. *J Exp Psychol* 1958; 55: 543-553.
- Dimpfel W., Suter A.** Sleep improving effects of a single dose administration of valerian/hops fluid extract—a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in parallel design using electrohypnograms. *Eur J Med Res* 2008; 26: 200–204.
- Dodson E.R., Zee P.C.** Therapeutics for circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med.Clin.* 2010, 5: 701-715.
- Donaldson E.M.** The pituitary intrarenal axis as indicator of stress in fish. In pickering, A.D, ed. *Stress and fish*. Academic press, London, 1981 pp.11-47

Durlach J., Pagès N., Bac P., Bara M., Guiet-Bara A. Biorhythms and possible central regulation of magnesium status, phototherapy, darkness therapy and chronopathological forms of magnesium depletion. *Magnes. Res.* 2002, 15: 49-66.

Erren T.C., Reiter R.J. Defining Chronodisruption. *J Pineal Res.* 2009: 46:245-7.

Escames G., León J., Macías M., Khaldy H., Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 2003, 17: 932-934.

Escobar C., Cailotto C., Angeles-Castellanos M., Delgado R.S., Buijs R.M. Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.* 2009, 30: 1665-1675.

Esquifino A.I., Castrillón P.O., García-Bonacho M., Vara E., Cardinali D.P. Effect of melatonin treatment on 24-hour rhythms of serum ACTH, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and insuline in rats injected with Freund's adjuvant. *J. Pineal Res.* 1999c; 27: 15-23.

Esquifino A.I., Pazo D., Cutrera R.A., Cardinali D.P. Seasonally dependent effect of ectopic pituitary grafts on 24-hour rhythms in serum prolactin and gonadotropins in rats. *Chronobiology international.* 1999a; 16: 451-460.

Esquifino A.I., Selgas L., Arce A., Della Maggiore V., Cardinali D.P. Twenty four hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen. Effect of cyclosporine. *Brain, Behavior and Immunity;* 1996; 10: 92-102.

Esquifino A.I., Selgas L., Vara E., Arce A., Cardinali D.P. Twenty-four hour rhythms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone,

growth hormone-releasing hormone and somatostatin in rats injected with Freund's adjuvant. *Biol. Signals recept*; 1999b; 8(3): 178-190.

Fernández Rodríguez M.J., Bautista Castaño I., Bello Luján L., Hernández Bethencourt L., Sánchez Villegas A., Serra L. Valoración nutricional de trabajadores sanitarios expuestos a turnicidad en Canarias. *Nutr. Hosp.* 2004; 19 (5): 286-291.

Ferrer R. Burnout o síndrome de desgaste profesional. *Med Clin (Barc)* 2002; 119:495-6.

Figard H., Girard C., Mougin F., Demougeot C., Berthelot A. Effects of aqueous hop (*Humulus lupulus* L) extract on vascular reactivity in rats: mechanisms and influence of gender and hormonal status. *Phythomed.* 2008; 15: 185– 93.

Finocchiaro L.M., Polack E., Nahmod V.E., Glikin G.C. Sensitivity of human peripheral blood mononuclear leukocytes to visible light. *Life Sci.* 1995, 57: 1097- 1110.

Flórez J., Hurle M.A. *Farmacología humana* 2º ed. Barcelona: Ed. Masson-Salvat Medicina; 1992: 383-97.

Franco L., Sánchez C., Bravo R., Rodríguez A.B., Barriga C., Cubero J. The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiologica Hungarica*, 2012a Volume 99 (2), pp. 133–139 DOI: 10.1556/APhysiol.99.2012.2.6

Franco L., Sánchez C., Bravo R., Rodríguez A.B., Barriga C., Romero E., Cubero J. The sedative effects of non-alcoholical beer in healthy female nurses. *PloS.* 2012b July Volume 7 Issue 7 e37290.

Frazer A. Pharmacology of antidepressants. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1997; 17(1): 25-18S.

Fryer J.L., Lederis K. Control of corticotropin secretion in teleost fishes. *Am. Zool.* 1986; 26, 1017–1026.

Fuller R.W., Wong D.T. Serotonin uptake and serotonin inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990; 600: 68-78.

Galzin A.M., Eon M.T., Esnaud H., Lee C.R., Pévet P., Langer S.Z. Day-night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Endocrinol.* 1988, 118: 389-397.

Gamperl A.K., Vijayam M.M., Boutilier R.G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish*, 1994; 4, 215-255.

García López A. Enfermería y turno de noche: trabajar contra corriente. *Inferm Ponent.* 2003; 8:1–7.

García López P., Capote Gil F., Quintana Gallego M.E. Valoración mediante escala de Epworth de la somnolencia diurna en pacientes con sospecha de síndrome de apneas obstructivas durante el sueño. Diferencias entre los pacientes y sus parejas. *Arch. Bronconeumol.* 2000; 36, 608-611.

García-Bonacho M., Cardinali D.P., Castrillón P., Cutrera R.A., Esquifino A.I.

Aging-induced changes in 24-h rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis. *Experimental Gerontology*. 2001; 36: 267-282.

García-Bonacho M., Esquifino A.I., Castrillón P.O., Reyes Toso C., Cardinali D.P.

Age-dependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats. *Life Science*. 2000; 66: 1969-1977.

García-Fernández J.M. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neuronales. En:

manual de neurociencia. Delgado J.M., Ferrús A., Mora F., Rubia F. (eds). Síntesis, Madrid. 1998. pp: 778-799.

Garrido M., Espino J., González-Gómez D., Lozano M., Barriga C., Paredes S.D.,

Rodríguez A.B. The consumption of a Jerte Valley cherry product in humans enhances mood, and increases 5-hydroxyindoleacetic acid but reduces cortisol levels in urine *Experimental Gerontology* 47 (2012) 573–580

Garrido M., Paredes S.D., Cubero J., Lozano M., Toribio-Delgado A.F., Muñoz J.L.,

Reiter R., Barriga C., Rodríguez A.B. Jerte Valley Cherry-Enriched Diets Improve Nocturnal Rest and Increase 6-Sulfatoxymelatonin and Total Antioxidant Capacity in the Urine of Middle-Aged and Elderly Humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010; 65:909–914.

Garvey M.J., Noyes R.Jr., Woodman C., Laukes C. Relationship of generalized anxiety

symptoms to urinary 5-hydroxyindoleacetic acid and vanillylmandelic acid. *Psychiatry Res*. 1995 Jun 29;57(1):1-5.

Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 1002-1012.

Gershon M.D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013 February; 20(1): 14–21. doi:10.1097/MED.0b013e32835bc703.

Gershon M.D. Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20: 3-14.

Gershon M.D., Drakontides A.B., Ross L.L. Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science.* 1965; 149: 197-199.

Gershon M.D., Sherman D.L., Pintar J.E. Type-specific localization of monoamine oxidase in the enteric nervous system: relationship to hydroxytryptamine neuropeptides and sympathetic nerves. *J. Comp. Neurol.* 1990; 301: 191-213.

Gershon M.D., Tack J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology.* 2007; 132: 397-414.

Ghosh S., Smriga M., Vuvor F., Suri D., Mohammed H., Armah S.M., Scrimshaw. Effect of lysine supplementation on health and morbidity in subject belonging to poor peri-urban households in Accra, Ghana. *Am J Clin Nutr;* 2010; 92:928-939.

Gibson E.M., Williams W.P., Kriegsfeld L.J. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp. Gerontol.* 2009, 44: 51-56.

Gil-Monte P., Peiró J.M. Desgaste psíquico en el trabajo: el síndrome de quemarse. 1997 Madrid: Síntesis.

Gingrich J.A., Hen R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2001; 155:1-10.

Gitlin M.J. Psychotropic medications and their effects on sexual function: diagnosis, biology, and treatment approaches. *J. Clin. Psychiatry*. 1994; 55: 406-413.

Giusti P., Gusella M., Lipartiti M., Milani D., Zhu W., Vicini S., Manev H. Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainite but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp. Neurol*. 1995, 131: 39-46.

Gómez G., Llorca R. Neurotransmisores: serotonina. *Biopsicología* 2000; (3)1pp 79-84

Gómez M., Irala C. Selección de benzodiazepinas. Bases para su utilización en el hospital. *Farm Hosp* 1996: 21(2):117-122.

Gómez-Abellán P., Madrid J.A., Ordovás J.M. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinol Nutr*. 2012: 59(1):50-61.

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 Funct* 2012; 3: 34-39.

González-Flores D., Velardo B., Garrido M., González-Gómez D., Lozano M., Ayuso M.C., Barriga C., Paredes S.D., Rodríguez A.B. Ingestion of Japanese plums

(*Prunus salicina* Lindl. cv. Crimson globe) increases the urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity levels in young, middle-aged, and elderly humans: Nutritional and functional characterization of their content. *J Food Nutr Res* 2011; 50: 229-236.

Gorinstein S., Zemser M., Vargas-Albores F., Ochoa J.L., Paredes-Lopez O., Scheler Ch., Salnikowe J., Martin-Belloso O., Trakhtenberg S. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. *Food Chemistry* 67 (1999) 71-78.

Grace M.S., Cahill G.M., Bersharse J.C. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 1991, 559: 56-63.

Grau A., Suñer R., García M.M. Desgaste profesional sanitario y su relación con los factores presonales y ambientales. *Gac Sanit.* 2005: 19(6):463-70.

Greene R., Siegel J. Sleep: a functional enigma. *Neuromolecular Med.* 2004; 5(1). Pp: 59-68. Review.

Gronstad K.O., De Magistris L., Dahlstrom A., Nilsson O., Price B., Zinnar M. J., Jaffe B.M., Ahlman H. The effects of vagal nerve stimulation on endoluminal release of serotonin and substance P into the feline small intestine. *Scand. J. Gastroenterol.* 1985; 20: 163-69.

Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med.Chem.* 2002, 2: 167-179.

Guerrero J.M., Carrillo-Vico A., Lardone P.J. La melatonina. *Investigación y Ciencia*. 2007, 373, 30-38.

Gutiérrez C.I., Urbina M., Obregon F., Glykys J., Lima L. Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *AminoAcids*. 2003; 25: 95-105.

Gyuton y Hall. Tratado de fisiología médica 11ª edición. Editorial Elsevier Saunders, 2006, pg 953-956.

Halford J.C., Harrold J.A., Boyland E.J., Lawton C.L., Blundell J.E. Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs*. 2007; 67: 27-55.

Hansel R., Wohlfart R., Coper H. Sedative-Hipnotic compounds in the exhalation of hops, II. *Z Naturforsch C.*; 1980; 35: 1096-1097.

Hänsel R., Wohlfart R., Coper H. Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops II. *Z. Naturforsch. C.* 1980; 35, 1096–1097

Hardeland R. Melatonin in aging and disease-multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis.* 2012, 3: 194-225.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more–occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65: 2001-2018.

Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. Melatonin-a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.* 2011, 93: 350-384.

Hashimoto S., Kohsaka M., Morita N., Fukuda N., Honma S., Honma K. Vitamin B12 enhances the phase-response of circadian melatonin rhythm to a single bright light exposure in humans. *Neurosci. Lett.* 1996, 220: 129-132.

Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J Postgrad Med.* 50: 145-149, 2004.

Hemmelgarn B., Suissa S., Huang A., Boivin J.F., Pinard G. Benzodiazepine use and the risk of motor vehicle crash in the elderly. *JAMA* 1997; 278: 27-31.

Hess W.R. Das Schlafsyndrom als Folge dencephaler Reizung. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1944; 2: 305-344.

Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T., Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 1974, 249: 1311-1313.

Hobbs W.R., Rall T.W., Verdoorn T.A. Hypnotics and sedatives; ethanol. En: Goodman & Gilman, eds. *The pharmacological basis of therapeutics.* 9^o ed. New York: International Edition. 1996; 1180-202.

Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 157-203.

- Hsu Wen, Chiu Nan, Liu Jui, Wang Chieh, Chang Ting, Laido Yi, Kuo Pei.** Sleep quality in heroin addicts under methadone maintenance treatment. *Acta Neuropsychiatr.* 2012; 24, 356-360.
- Huether G., Poeggeler B., Reimer A., George A.** Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 1992, 51: 945-953.
- Hussain A.M., Mitra A.D.** Effect of ageing on tryptophan hydroxylase in rat brain: Implications on serotonin level. *Drug Metab. Dispo.* 2000, 28: 1038-1042.
- Ianas O., Olinescu R., Badescu I.** Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie.* 1991, 29: 147-153.
- Iguichi H., Kato K.I., Ibayashi H.** Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 27-9.
- Illnerova H., Sumova A., Travnickova Z., Jac M., Jelinkova D.** Hormones, subjective night and season of the year. *Physiol Res.* 2000; 49 Suppl 1:S1-10.
- Iriti M., Varoni E.M., Vitalini S.** Melatonin in traditional Mediterranean diets. *J.Pineal Res.* 2010, 49: 101-105.
- Ito T., Yamadera H., Ito R., Suzuki H., Asayama K., Endo S.** Effects of vitamin B12 on bright light on cognitive and sleep-wake rhythm in Alzheimer-type dementia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2001, 55: 281-282.

Itoh M.T., Ishizuka B., Kuribayashi Y., Amemiya A., Sumi Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum.Reprod.* 1999, 5: 402-408.

Iversen L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS discovery. *Mol. Psychiatry.* 2000; 5: 357-362.

Jeyabalan G., Geller D.A. The importance of platelet-derived serotonin in mediating hepatic regeneration. *J. Hepatol.* 2006; 45: 629-630.

Jouvet M. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol* 1962; 100: 125-206.

Kalant H., Poikolainen K. Moderate drinking: concepts, definitions and public health significance. En: *Health issues related to alcohol consumption.* IISI Europe (Executive editor: MacDonald I). Brussels: Blackwell Science, 1999.

Kang K., Lee K., Park S., Kim Y.S., Bask K. Enhanced production of melatonin by extopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J. Pineal Res.* 2010, 9: 176-182.

Kato S., Fujiwara I., Yoshida N. Nitrogen-containing heteroalicycles with serotonin receptor binding affinity: development of gastroprokinetic and antiemetic agents. *Med.Res. Rev.* 1999; 19: 25-73.

Kaumann A.J., Levy F.O. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* 2006; 111: 674-706.

- Keiler A.M., Zierazu O., Kretzschmar G.** Hop Extracts and Hop Substances in Treatment of Menopausal Complaints. *Planta Med.* 2013; 79(07): 576-579 79 (07): pp. 576-567. doi:10.1055/s-0032-1328330)
- Killgore W.D.S., Balkin T.J., Wesensten N.J.** Impaired decision making following 49 h of sleep deprivation. *J. Sleep Res.* 2006; 15, 7–13.
- Killgore W.D.S., Killgore D.B., Day L.M., Li C., Kamimori G.H., Balkin T.J.** The effects of 53 hours of sleep deprivation on moral judgment. *Sleep.* 2007; 30, 345-352.
- Kolár J., Machácková I.** Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J. Pineal Res.* 2005, 39: 333-341.
- Kolker D., Turek F.** Circadian rhythms and sleep in aging rodents. En: *Functional Neurobiology of Aging.* Edited by Hof P.R., Mobbs C.V. San Diego: Academic Press. 2001; pp: 869-882.
- Kondratova A.A., Kondratov R.V.** The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012, 13: 325-335.
- Kotler M., Rodríguez C., Sáinz R.M., Antolín I., Menéndez-Peláez A.** Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 1998, 24: 83-89.
- Kotronoulas G., Stamatakis A., Stylianopoulou F.** Hormones, hormonal agents, and neuropeptides involved in the neuroendocrine regulation of sleep in humans. *Hormone;* 2010: 8:232-248.

Kundrotas W., Gregg V. Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the rat after immobilization stress. *Physiology & Behavior*. Volume 19, Issue 6, December 1977; Pages 739-741

Labunet's I.F. Age-related changes in circadian and circannual responses and the number of cells in lymphoid organs of animals: a possible connection to thymic factors. *Fiziol*; 2001. 47(5): 54-62.

Lam D.D., Przydzial M.J., Ridley S.H., Yeo G.S., Rochford J.J., O'Rahilly S., Heisler L.K. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology*. 2008; 149: 1323-1328.

Launay J.M., Lamaitre B.J., Husson H.P., Dreux C., Hartmann L., Da Prada M. Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci*. 1982, 31: 1487-1494.

Lazarus R.S., Folkman S. *Estrés y procesos cognitivos*. Barcelona: Martínez Roca. 1986.

Lederis K.P., Ichikawa T., Richter D., Schönrock C. Molecular analysis of corticotropin-releasing factors and related peptides in teleosts. In Hochachka, P.W. and Mommsen, T.P., eds *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 2: *Molecular Biology Frontiers*. Elsevier Science, Amsterdam, New York, 1993 pp. 325-338.

Lee K.M., Jung K.S., Song D.K., Krauter M., Kim H.Y. Effects of *Humulus lupulus* extract on the central nervous system in mice. *Planta Med* 1993; 59 (Suppl): A691.

Leigh Gibson E., Stuart Checkley M.B., Papadopoulos A., Poon L., Daley S., Wardle S. Increased Salivary Cortisol Reliably Induced by a Protein-Rich Midday Meal. *Psychosomatic Medicine* 1999: 61:214-224.

León J., Acuña-Castroviejo D., Sainz R.M., Mayo J.C., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 2004, 75: 765-790.

Liu R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 517S-520S.

López A., Rol M.A., Madrid J.A. Ritmos biológicos en la nutrición y metabolismo. En: *Cronobiología básica y clínica.* Madrid J.A. y Rol de Lama M.A., eds. Editec@Red. 2006, 513-553.

López-Burillo S., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Manchester L.C., Reiter R.J. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J. Pineal Res.* 2003, 34: 269-277.

Magalhaes P.J., Carvalho D.O., Cruz J.M., Guido L.F., Barros A.A. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun* 2009; 45: 591–610.

Magoun H.W, Rhines R. An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *Journal of Neurophysiology* 1946; 9: 165-171.

Magrini N., Vaccheri A., Parma E., D'Alessandro R., Bottoni A., Occhionero M., Montanaro N. Use of benzodiazepines in the Italian general population: prevalence, pattern of use and risk factors for use. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 50: 19-25.

Maldonado M., Moreno H., Calvo J.R. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition*; 2009; 28: 188-191.

Manchester L.C., Tan D.X., Reiter R.J., Park W., Monis K., Qi W. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sci.* 2000, 67: 3023-3029.

Maquet P. Brain mechanisms of sleep: contributions of neuroimaging techniques. *J Psychopharmacol* 1999; 13 (Suppl 1): S25-8.

Marín H.A., Sosa S., Vivanco D., Aristizábal N., Berrio M.C., Vinaccia S. Factores culturales que privan el sueño y causan somnolencia excesiva en estudiantes universitarios: un estudio piloto. *Psicol. Salud.* 2005; 15, 57-68

Markwald R.R., Lee-Chiong T.L., Burke T.M., Snider J.A., Wright Jr.K.P. Effects of the melatonin MT-1/MT-2 agonist ramelteon on daytime body temperature and sleep. *Sleep.* 2010, 33: 825-831.

Masson-Pévet M. Melatonin in the circadian system. *J. Soc. Biol.* 2007; 201: 77-83.

Mateos S.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 Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2009; 104: 52-59.

Mayer G., Kröger M., Meier-Ewert K. Effects of vitamin B12 on performance and circadian rhythm in normal in normal subjects. *Neuropsychopharmacology.* 1996; 15: 456-464.

- Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V., Rodríguez C.** Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2002, 59: 1706-1713.
- Mayorga M., Iborra A., Estany S., Maartinez P.** Protective effect of vitamin E in a animal model of LPS: induced inflammation. *Am. J. Reprod. Immunil.* 2004; 52, 365-261 .
- McElduff P., Dobson A.** How much alcohol and how often? Population based case-control study of alcohol consumption and risk of a major coronary event. *Br J Med* 1997; 314:1159-64
- McEvoy G.K.** Benzodiazepinas. *AHFS 96 Drug Information.* Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists. 1996; 1694-719.
- Meissner O., Haberlein H.** Influence of xanthohumol on the binding behaviour of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Plant Med* 2006; 72 : 656–8.
- Melchiorri D., Reiter R.J., Attia A.M., Hara M., Burgos A., Nistico G.** Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci.* 1995, 56: 83-89.
- Mhatre M.C., Van Jaarsveld A.S., Reiter R.J.** Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 153: 1186-1192.
- Mignot E., Taheri S., Nishino S.** Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci* 2002; 5 (Supl): S1071-5.

Miguel J.J. Ansiedad ante los exámenes, evolución histórica y aportaciones prácticas para su tratamiento. Tobal Dialnet 1996 Vol 2 nº 2-3, 195-209.

Misra R., McKean M. College' students academic stress and its relation to their anxiety, time management, and leisure satisfaction. American Journal of Health Studies, 2000; 16, 41-51.

Molinoff P.B. Biochemistry of catecolamines. Annu. Rev. Biochem. 1971; 40:465-500.

Monti J.M. La hipótesis serotoninérgica de la depresión. Revista de Psiquiatría de Uruguay. 1998, 62: 60-68.

Moore R.Y. Circadian Timing. En: Fundamental Neuroscience. Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R. (eds). "Academic Press, San Diego. 1999; pp: 1189-1206.

Morin C.M., Koetter U., Bastien C., Ware J.C., Wooten V. Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia; a randomized placebo-controlled clinical trial. Sleep 2005; 28: 1465–1471.

Morris C.J., Aeschbach D., Scheer F.A. Circadian system, sleep and endocrinology. Moll. Cell. Endocrinol. 2012, 349: 91-104.

Moruzzi G., Magoun H.W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. 1949. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1995; 7: 251- 267.

Muñoz F.J. El estrés académico. Problemas y soluciones desde una perspectiva psicosocial. Huelva: Publicaciones Universidad de Huelva. 2003.

- Nagata C., Nagao Y., Shibuya C., Jashiki Y., Shimizu H.** Association of vegetable intake with urinary 6-sulfatoxymelatonin level. *Cancer Epidemiol.* 2005, 14: 1333-1335.
- Nebigil C.G., Etienne N., Messaddeq N., Maroteaux L.** Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB J.* 2003; 17: 1373-1375.
- Nelson J., Chouinard G.** Guidelines for the clinical use of benzodiazepines: pharmacokinetics. Dependency, rebound and withdrawal. Canadian Society for Clinical Pharmacology. *Can J Clin Pharmacol* 1999; 6: 69-83.
- 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_{2C} receptor inactivation induce appetite-suppressing effects in mice via 5-HT_{1B} receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007; 10: 675-681.
- Okazaki M., Higuchi K., Hanawa Y., Shiraiwa Y., Ezura H.** Cloning and characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA arylalkylamine Nacetyltransferase and its use in the genetic engineering of melatonin content in the Micro-Tom tomato. *J. Pineal Res.* 2009, 46: 373-382.
- Olivier B., van Oorschot R., Waldinger M.D.** Serotonin, serotonergic receptors, selective serotonin reuptake inhibitors and sexual behaviour. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1998; 6:S9-14.
- Ouichou A., Pévet P.** Implication of tryptophan in the stimulatory effect of deltasleepinducing, peptide on indole secretion from perfused rat pineal glands. *Biol. Signals.* 1992; 1: 78-87.

Pablos M.I., Reiter R.J., Ortiz G.G., Guerrero J.M., Agapito M.T., Chuang J.I., Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 1998, 32: 69-75.

Pace-Schott E.F., Hobson J.A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 591-605. 16. Steriade M. Arousal: revisiting the reticular activating system. *Science* 1996; 272: 225-6.

Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006, 273: 2813-2838.

Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Assessment of the potential role of tryptophan as the precursor of serotonin and melatonin for the aged sleep/wake cycle and immune function: *Streptopelia risoria* as a model. *Int. J. Tryptophan Res.* 2009c, 2: 23-36.

Paredes S.D., Bejarano I., Terrón M.P., Barriga C., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Melatonin and tryptophan counteract lipid peroxidation and modulate superoxide dismutase activity in ringdove heterophils in vivo. Effect of antigen-induced activation and age. *AGE (Dordr).* 2009d, 31: 179-188.

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. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2009a, 64: 340-350.

Paredes S.D., Terrón M.P., Marchena A.M., Barriga C., Pariente J.A., 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*). *Mol. Cell. Biochem.* 2007b, 304: 305-314.

Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Assessment of the potential role of tryptophan as the precursor of serotonin and melatonin for the aged sleep-wake cycle and immune function: *Streptopelia risoria* as a model. *International J. Tryptophan Res.* 2009b; 2: 23-36.

Parlakpınar H., Ozer M.K., Sahna E., Vardi N., Cigremis Y., Acet A. Amikacin induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *J. Pineal Res.* 2003, 35: 85-90.

Pazo D. Estudio cronobiológico del papel de la inervación simpática en la modulación de la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares. Efecto de la melatonina. Tesis doctoral, Directora: Ana I. Esquifino. 2002

Peart W.S., Andrews T.M., Robertson J.I. Carcinoid syndrome. Serotonin release induced with intravenous adrenaline or noradrenaline. *Lancet.* 1961; 1: 577-578.

Pecknold J., Ini L.J., Suranyi-Cadotte B.E., Bernier B., Luthe L., Nair N.P., Meaney M.J. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from [3H]imipramine and [3H]paroxetine binding on human platelets. *Biol. Psychiatry.* 1994; 36(5): 281-291.

Peppers M.P. Benzodiazepines for alcohol withdrawal in the elderly and in patients with liver disease. *Pharmacotherapy* 1996; 16:49-58.

Pérez C. Los alimentos y el sueño. 2003. Masson, Barcelona.

Petrie K., Conaglen J.V., Thompson L., Chamberlain K. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ*. 1989; 298(6675): 705-707.

Peuhkuri K., Sihvola N., Korpela R. Diet promotes sleep duration and quality. *Nutr. Res.* 2012, 32: 309-319.

Pévet P., Agez L., Bothorel B., Saboureau M., Gauer F., Laurent V., Masson-Pévet M. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol. Int.* 2006; 23: 39-51.

Philibert I. Sleep loss and performance in residents and nonphysicians: a meta-analytic examination. *Sleep*. 2005; 28, 1392-1402 (2005)

Piendl A. Inhaltsstoffe alkoholischer Getränke - Bier. En: *Alkoholische Getränke und Ernährungsmedizin*. Kluthe R, Kasper H, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1998, pp 66-9.

Pieri C., Marra M., Moroni F., Recchioni R., Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994, 55: PL271-276.

Pinto C., Duque A.L., Rodríguez-Galdón B., Cestero J.J., Macías P. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50:3405-3412.

Pittendrigh C.S. Circadian rhythms and the circadian organization of living system. *ColdSpring Harbor Symposiom. Quant. Biology.* 1960. 25:159-184.

Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine* 2005, 27: 201-212.

- Poeggeler B., Hardeland R.** Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res.* 1994 Aug;17(1):1-10
- Poikolainen K.** It can be bad for the heart, too: drinking patterns and coronary heart disease. *Addiction* 1998; 93:1757-9.
- Posada J.** Estudio recopilatorio "Cerveza y salud". Escuela Superior de Cerveza y Salud 1998.
- Posmyk M.M., Batabusta M., Wieczorek M., Siliwinska E., Janas K.M.** Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *J. Pineal Res.* 2009, 46: 214-223.
- Purselle D.C., Nemeroff C.B.** Serotonin transporter: a potential substrate in the biological suicide. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28: 613-619.
- Quay W.B.** General biochemistry of the pineal gland of mammals. En: *The Pineal Gland: Anatomy and Biochemistry.* Reiter R.J., ed. CRC Press Inc. 1981, 178-198.
- Rafter J.J.** Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br. J. Nutr.* 2002; 88:219S-224S.
- Ramírez A.J., Graham J., Richards M.A., Cull A., Gregory W.M.** Mental health of hospital consultants: the effects and satisfaction at work. *Lancet.* 1996 347:724-8.
- Rapport M.M., Green A.A., Page I.H.** Crystalline Serotonin. *Science.* 1948, 108:329-330.

Ratajczak H.V., Lange R.W., Sothorn R.B., Hagen R.B., Vescei P., Wu J., Halberg F., Thomas P.T. Surgical influence on murine immunity and tumor growth: relationship of body temperature and hormones with splenocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1992; 199: 432-440.

Ray W.A., Griffin M.R., Downey W. Benzodiazepines of long and short elimination half-life and the risk of hip fracture. JAMA 1989; 262: 3303-07.

Rayón P., Montero D., Santamaría B., Madurga M. De Abajo FJ. Benzodiazepines consumption in Spain. Eur J Clin Pharmacol 1997; 52: 321-3.

Refinetti R. Circadian physiology. Ed. CRC Press. Florida, Estados Unidos. 2006.

Reiter R.J. Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. News Physiol. Sci. 1991b, 6: 223-227.

Reiter R.J., Fuentes-Broto L., Paredes S.D., Tan D.X. Melatonin and the pathophysiology of cellular membranes. Marmara Pharmaceut. J. 2010b, 14: 1-19.

Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D.X. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. Nutrition. 2005, 21: 920-924.

Reiter R.J., Paredes S.D., Manchester L.C., Tan D.X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2009b, 44: 175-200.

Reiter R.J., Tan D.X. Melatonin: an antioxidant in edible plants. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002, 957: 341-344.

Reiter R.J., Tan D.X. What constitutes a physiological concentration of melatonin?
J.Pineal Res. 2003, 34: 79-80.

Reiter R.J., Tan D.X., Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. Prog.Brain
Res. 2010a, 181: 127-151.

**Reiter R.J., Tan D.X., Fuentes-Broto L., Paredes S.D., Sánchez-Barceló E., Mediavilla
M.D.** Melatonin salvages neural tissue from ischemia/reperfusion injury. The
Open Neuroendocrinol. J. 2010c, 3: 112-120.

Reiter R.J., Tan D.X., Jou M.J., Korkmaz A., Manchester L.C., Paredes S.D. Biogenic
amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites.
NeuroEndocrinol. Lett. 2008a, 29: 391-398.

**Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Artemis P., Simopoulos A.P., Maldonado M.D.,
Flores L.J., Terrón M.P.** Melatonin in edible plants (phytomelatonin):
identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. World
Rev. Nutr. Diet. 2007; 97: 211-230.

Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Paredes S.D., Mayo J.C., Sainz R.M. Melatonin
and reproduction revisited. Biol. Reprod. 2009a, 81: 445-456.

Reynolds J.E.F., Martindale W. The extra pharmacopoeia. 30^o ed. London: The
Pharmaceutical Press. 2009; 584-9.

Rhines R., Magoun H.W. Brainstem facilitation of cortical motor responses. Journal of
Neurophysiology 1946; 9: 219-229.

Roberfroid M.B. Global view on functional foods: European perspectives. Br. J. Nutr.
2002; 88: 133S-138S.

Robinson C.R., Pegram G.V., Hyde P.R., Beaton J.M., Smythies J.R. The effects of nicotinamide upon sleep in humans. *Biol. Psychiatry*. 1977, 12: 139-143.

Rodrigues R.N.D., Viegas C.A.A., Abreu E., Silva A.A.A., Tavares P. Daytime sleepiness and academic performance in medical students. *Arq. Neuropsiquiatr*. 2002 60, 6-11.

Rodríguez A.B., Nogales G., Marchena J.M., Barriga C. Supression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem. Pharmacol*. 1999, 58: 1301-1306.

Rodriguez R.J., Miranda C.L., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R. Influence of prenylated and non-prenylated flavoniods on the liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rats hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2001; 39:437-445.

Romeo J., Warnberg J., Nova E., Ligia E., González-Gros., Marcos A. Changes in the Immune System after Moderate Beer Consumption. *Ann Nutr & Metab* 2007a; 51: 359-366.

Romeo J., Warnberg R., Diaz L.E., Gonzalez-Gross M., Marcos A. Effect of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem* 2007b.63:153-9.

Romero J., Gonzalez-Gross M., Warnberg J., Diaz L.E., Marcos A. Does beer have an impact on weight gain? Effects of moderate beer consumption on body composition. *Nutr Hosp*. 2007c;22:223-8.

Romero J.A., Axelrod J. Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. *Science*. 1974, 184: 1091-1092.

Ross S.M. Sleep disorders: a single dose administration of valerians/hops fluids extract (dormeasan) is found to be effective in improving sleep. *Holist Nurs Pract* 2009; 23: 253–6.

Ruíz de la F.M., Cifuentes M., Segura B.O., Chavarria S.P., Sanhueza R.X. Estado nutricional de trabajadores bajo turnos rotativos o permanentes. *Rev Chil Nutr* 2010; 37(4): 446-454.

Sack R.L., Auckley D., Auger R.R., Carskadon M.A., Wright K.P.Jr., Vitiello M.V., Zhdanova I.V. Circadian rhythm sleep disorders: part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* 2007a; 30:1484-501.

Salter S., Brownie S. Treating primary insomnia-the efficacy of valerian and hops. *Aust Fam Physician* 2010; 39: 433–7.

Sánchez C.L., Franco L., Bravo R., Rubio C., Rodríguez A.B., Barriga C., Cubero J. Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2010; 16(3):160-163.

Sandyk R. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. *Int. J. Neurosci.* 1992; 67: 127-144.

Sanvisens A. Ritmos y relojes biológicos: Introducción a la cronobiología. Promociones y publicaciones universitarias, Barcelona. 1989.

Saper C.B., Chou T.C., Scammell T.E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep wakefulness. *Trends Neurosci* 2001; 24: 726-31.

Schellenberg R., Sauer S., Abourashed E., Koetter U., Brattstrom A. The fixed combination of valerian and hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med*; 2004; 70: 594-597.

Schreiber R., Selbach K., Asmussen M., Hesse D., de Vry, J. Effects of serotonin (1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. *Pharmacol.Biochem. Behav.* 2000, 67: 291-305.

Selgas L., Pazo D., Arce A., Esquifino A.I., Cardinali D.P. Circadian rhythms in adenohipophysial hormone levels and hypothalamic monoamine turnover in mycobacterial-adjuvant-injected rats. *Biological Signals and Receptors.* 1998; 7: 15- 24.

Sewerynek E., Reiter R.J., Melchiorri D., Ortiz G.G., Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology.* 1996, 43: 898-905.

Shen W.W., Hsu J.H. Female sexual side effects associated with selective serotonin reuptake inhibitors: a descriptive clinical study of 33 patients. *Int. J. Psychiatry. Med.* 1995; 25: 239-48.

Shida C.S., Castrucci A.M., Lamy-Freund M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 1994, 16: 198-201.

- Shifow A.A., Kumar K.V., Naidu M.U., Ratnakar K.S.** Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron*. 2000, 85: 167-174.
- Sierra J.C., Fernández-Guardiola A., Luna-Villegas G., Buela-Casal G.** Efectos residuales de las benzodiacepinas sobre la atención en humanos. *Psicothema*. 1993 Vol. 5, nº 2, pp. 227-291.
- Skene D.J., Lockley S.W., Arendt J.** Use of melatonin in the treatment of phase shift and sleep disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 467: 79-84.
- Smith-Coggins R., Rosekind M.R., Hurd S., Buccino K.R.** Relationship of day versus night sleep to physician performance and mood. *Ann. Emerg. Med.* 1994; 24, 959-961.
- Smriga M., Ghosh S., Mouneimne Y., Pellett L., Scrimshaw K.** Lysine fortification reduces anxiety and lessens stress in family members in economically weak communities in Northwest Syria. *PNAS* June 1, 2004 vol. 101 no. 22 8285–8288.
- Smriga M., Torii K.** L-Lisnina acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 100, 15,370-15,375.
- Sodhi M.S., Sanders-Bush E.** Serotonin and brain development. *Int. Rev. Neurobiol.* 2004, 59: 111-174.
- Somerville E.M., Horwood J.M., Lee M.D., Kennett G.A., Clifton P.G.** 5-HT (2C) receptor activation inhibits appetitive and consummatory components of

feeding and increases brain c-fos immunoreactivity in mice. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 3115-24.

Stephen G. Reid, Nicholas J. Bernier, Steve F. Perry. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 120 (1998) 1–27.

Steriade M., Dossi R.C., Nunez A. Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronizaAn. Sist. Sanit. Navar. 1991 Vol. 30, Suplemento 1 17

Sumpter J.P., Dye H.M., Benfey T.J. The effects of stress on plasma ACTH, -MSH, and cortisol levels in salmoid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1986: 62, 377–385.

Taheri S., Lin L., Austin D., Young T., Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med.* 2004; 1(3):e62.

Takahashi J.S. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual Reviews of Neuroscience.* 1995. 18: 531-553.

Takahashi J.S., Murakami N., Nikaido S.S., Pratt B.L., Robertson L.M. The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Recent Prog Horm Res.* 1989; 45: 279-348; discussion 348-52.

Takahashi T., Sasaki M., Itoh H., Yamadera W., Ozone M., Obuchi K., Hayashida K., Matsunaga N. Sano H. Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by an 11-hour eastward flight. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2002; 56: 301-302.

Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1993a, 1: 57-60.

Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Korkmaz A., Ma S., Rosales-Corral S., Reiter R.J. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 2012, 63: 577-597.

Tan D.X., Manchester L.C., Di Mascio P., Martínez G.R., Prado F.M., Reiter R.J. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB J.* 2007a, 21: 1724-1729.

Tan D.X., Manchester L.C., Helton P., Reiter R.J. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signal Behav.* 2007b, 2: 514–516.

Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol. Signals Recept.* 1999b, 8: 70-74.

Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Hardies L.J., Weintraub S.T., Vijayalaxmi, Sheperd A.M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 253: 614-620.

Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Limson J., Weintraub S.R., Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic. Biol. Med.* 2000b, 29: 1177-1185.

- Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Qi W., Hanes M.A., Farley N.J.** Highphysiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 1999a, 65: 2523-2529.
- Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Qi W.B., Karbownik M., Calvo J.R.** Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 2000a, 9: 137-159.
- Tan D.X., Poeggeler B., Reiter R.J., Chen L.D., Chen S., Manchester L.C., Barlow-Walden L.R.** The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993b, 70: 65-71.
- Tellería J.L.** Distribución en el espacio y en el tiempo. En: *zoología evolutiva de los vertebrados*. Síntesis, Madrid. 1987; pp: 145-155.
- Telliez F., Bach V., Leke A., Chardon K., Libert J.P.** Feeding behavior in neonates whose diet contained medium-chain triacylglycerols: short-term effects on thermoregulation and sleep. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76: 1091-1095.
- Terrón M.P., Paredes S.D., Barriga C., Ortega E., Reiter R.J., Rodríguez A.B.** Melatonin, lipid peroxidation and age in heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Free Radic. Res.* 2005, 39: 613-619.
- Touitou Y., Selmaoui B., Zhao Z.Y., San Martin M., Bogdan A.** Melatonin and biological rhythms: various aspects in human physiopathology. *Ann Pharm Fr.* 1996; 54(6): 241-250.

- Túnez I., Muñoz M.C., Medina F.J., Salcedo M., Feijóo M., Montilla P.** Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuroand hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem. Funct.* 2007, 25: 119-127.
- Underwood H., Steele C.T., Zivkovic B.** Circadian organization and the role of the pineal in birds. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 53: 48-62.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference.** Consultado en 2012. <http://ndb.nal.usda.gov/>
- Vacas M.I., Keller Sarmiento M.I., Cardinali D.P.** Interaction between alpha- and betaadrenoceptors in rat pineal adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activation. *J Neural Transm.* 1985; 62:295-304.
- Vakkuri O., Rintamaki H., Leppaluoto J.** Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1985, 58:69-75.
- Verster J.C, Volkerts E.R, Verbanten M.N.** Effects of alprazolam on driving ability, memory functioning and psychomotor performance: a randomized, placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 260-9
- Verwey M., Amir S.** Food-entrainable circadian oscillators in the brain. *Eur. J. Neurosci.* 2009, 30: 1650-1657.
- Vialli M., Erspamer V.** Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll. Soc.Med.-Chir. Pavia.* 1937, 51: 357-363.

Villablanca J.R., De Andres I., Olmstead C.E. Sleep-waking states develop independently in the isolated forebrain and brain stem following early postnatal midbrain transaction in cats. *Neuroscience* 2001; 106: 717-731.

Villanueva V.L., Valía J.C., Cerdá G., Monsalve V., Bayona M.J. de Andrés J. Fibromialgia: diagnóstico y tratamiento. El estado de la cuestión *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2004; 11: 430-443.

Von Economo C. Encephalitis lethargica. *Wien Med Wochr* 1923; 73: 777-782, 835-838, 1113-1117, 1243-1249, 1334-1338.

Von Economo C., En Brodal A. The reticular formation and some related nuclei. En: Oxford University Press. *Neurological anatomy in relation to clinical medicine.* New York, 1981.

Vonderheid-Guth B., Todorova A., Brattstrom A., Dimpfel W. Pharmacodynamic effects of valerian and hops extract combination (Ze 91019) on the quantitative-topographical EEG in the healthy volunteers. *Eur J Med Res* 2000 5: 139–144.

Wade P.R., Tamir H., Kirchgessner A.L., Gershon M.D. Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotypic antibodies to 5-HT receptors. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: 403-416.

Wakatsuki A., Okatani Y., Shinohara K. Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondria damage. *J. Pineal Res.* 2001, 30: 22-28.

Warren W.S., Cassone V.M. The pineal gland: photoreception and coupling of behavioral, metabolic, and cardiovascular circadian outputs. *J. Biol. Rhythms.* 1995; 10: 64-79.

Weeks B.S. Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian. *Med Sci Monit*; 2009; 15: 256-262.

Wiggins C.L., Schmidt-Nowara W.W., Coultas D.B., Samet J.M. Comparison of self- and spouse reports of snoring and other symptoms associated with sleep apnea syndrome. *Sleep*. 1990; 13, 245-252.

Winberg S., Overli O., Lepage O. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-Tryptophan. *J. Exp. Biol.* 2001; 204: 3867-3876.

Xu X.D., Sun Y., Guo X.Q., Sun B., Zhang J. Effects of exogenous melatonin on ascorbate metabolism system in cucumber seedlings under high temperature stress. *Ying Yong Shen Tai Xue Bao*. 2010, 21: 2580-2586.

Yamamoto H., Mohanan P. Ganglioside GT1B and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. Volume 964, Issue 1, 21 February 2003, Pages 100–106

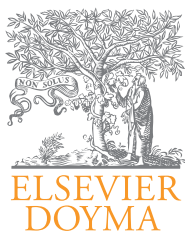
Young S.N., Leyton M. The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 857- 865.

Yura A., Kiuchi Y., Uchikawa T., Uchida J., Yamazaki K., Oguchi K. Possible involvement of calmodulin-dependent kinase in Ca²⁺-dependent enhancement of [3H]5-hydroxytryptamine uptake in rat cortex. *Brain Res.* 1996; 738(1):96-102.

- Zanoli P., Rivasi M., Zavatti M., Brusiani F., Baraldi M.** New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 102, 102–106.
- Zanoli P., Zavatti M.** Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 116:383-96.
- Zanoli P., Zavatti M., Rivasi M., Brusiani F., Losi G., Puia R., Avallone R., Baraldi M.** (Evidence the B-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacol* 2007; 109: 87-92.
- Zatz M., Mullen D.A.** Norepinephrine, acting via adenylate cyclase, inhibits melatonin output but does not phase-shift the pacemaker in cultured chick pineal cells. *Brain Res.* 1988; 450: 137-143.
- Zhang H., Squadrito G.L., Uppu R., Pryor W.A.** Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* 1999, 12: 526-534.
- Zhang L., Guadarrama L., Corona-Morales A.A., Vega-González A., Rocha L., Escobar A.** Rats subjected to extended L-tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 562-70.
- Zhang L.I., Jia J.F., Hao J.G., Cen J.R., Li T.K.** A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. *Mutat. Res.* 2011, 721: 153-156.

7. Anexa





REVISIÓN

Cerveza y salud, beneficios en el sueño

C.L. Sánchez^a, L. Franco, R. Bravo^a, C. Rubio^a, A.B. Rodríguez^a, C. Barriga^a
y J. Cubero^{b,*}

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Badajoz, España

^bÁrea de Docencia de Ciencias Experimentales, Facultad de la Educación, Badajoz, España

Aceptado para su publicación el 3 de agosto de 2010.

PALABRAS CLAVE

Cerveza;
Salud;
Sueño;
Lúpulo

Resumen

La cerveza goza, en nuestra sociedad, de una reconocida estima dentro de la dieta mediterránea, su ingesta moderada es fuente de numerosos y beneficiosos nutrientes. Pero desde estas últimas décadas se estudia la cerveza no desde un punto de vista puramente nutricional, sino como herramienta promotora de la salud. Sus posibilidades preventivas, gracias a ciertos componentes, son innumerables contra enfermedades óseas y circulatorias y cáncer. Desde este trabajo y siempre con una ingesta moderada, se quiere abordar el posible beneficio de la cerveza desde una nueva perspectiva: de regular el sueño, gracias a la acción sedante principalmente del lúpulo que posee esta bebida
© 2010 SENC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Beer;
Health;
Sleep;
Hops

Beer and health: Benefits for sleep

Abstract

In our society, beer is recognized to be a component of the Mediterranean diet and moderate intake of this beverage provides numerous beneficial nutrients. However, in the last few decades, beer has been considered not only from a purely nutritional point of view but also in the context of health promotion. Multiple components contribute to the preventive potential of beer against bone and circulatory diseases and cancer. The present article discusses the possible benefits of moderate beer intake from a new perspective: that of regulating sleep due to the sedative action of hops, one of the components of beer.
© 2010 SENC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia
Correo electrónico: jcubero@unex.es (J. Cubero).

Fundamentos y componentes

La cerveza es una bebida fermentada típica y tradicional de nuestra dieta mediterránea, puede estar relacionada con esparcimiento y ocio, pero en estos últimos 20 años se ha demostrado, mediante numerosas investigaciones biomédicas, que la ingesta moderada es beneficiosa para la salud. Esta bebida, de baja graduación alcohólica (4°-5°), no contiene grasas, su aporte calórico es moderado (45 kcal/100 ml) y contiene numerosas vitaminas hidrosolubles y fibra, además de minerales, pero con baja concentración de sodio.

Uno de los principales investigadores sobre la cerveza, el Prof. y Dr. Anton Piendl, así como el Dr. Javier Posada, experto de la Escuela de Cerveza y Malta¹, destaca los componentes positivos para la salud:

Lúpulo: la cerveza es la única bebida que contiene lúpulo, un sedante suave y un amargor estimulante del apetito. En las flores femeninas del lúpulo están las denominadas glándulas de lupulina, una resina de color amarillento, extraída de los pétalos, que durante el proceso de elaboración de la cerveza se transforma en sustancias amargas. Esta resina contiene ácidos alfa y beta, polifenoles y aceites esenciales, constituyentes naturales que confieren a la cerveza algunas de sus propiedades saludables.

Malta: proporciona a la cerveza los carbohidratos, minerales, elementos trazas y los ácidos orgánicos y vitaminas importantes para la vida.

Agua: es el mayor y más importante componente de la cerveza, con 92 g/100 g. El poder refrescante de la cerveza se debe tanto a su alto contenido en agua como a los minerales que contiene.

Contenido de calorías: cada 100 ml de cerveza contiene entre 30 y 40 kcal.

Compuestos proteínicos: la cerveza es realmente pobre en contenido proteínico; sin embargo, contiene los 20 aminoácidos esenciales y muchos no esenciales.

Minerales y elementos trazas: la cerveza contiene más de 30 minerales entre elementos trazas, la mayoría de estos se origina en la cebada malteada. Un litro de cerveza satisface casi la mitad de las necesidades diarias de magnesio de un adulto, y un 40 y un 20 respectivamente, de las necesidades diarias de fósforo y potasio. Así, al ser rica en potasio y baja en sodio, es una bebida diurética.

Vitaminas: la cerveza contiene todas las vitaminas importantes del grupo B, además de las vitaminas A, D y E. Por ejemplo, con 1 l de cerveza se cubre el 35% de la necesidad diaria de vitamina B₆, el 20% de la B₂ y el 65% de la B₃ niacina. Un litro de cerveza contiene cerca de 210 mg de vitaminas y de compuestos similares.

Gas carbónico: la cerveza contiene aproximadamente 0,5 g de CO₂ por 100 g de cerveza, lo que proporciona una característica refrescante. Además, el gas carbónico favorece la circulación sanguínea de la mucosa bucal, promueve la salivación, estimula la formación de ácido en el estómago y acelera el vaciamiento del estómago, todo ello favorable para una buena digestión.

Polifenoles: el contenido, del orden de 150-153 mg/l, es relativamente alto. Los polifenoles, que tienen poder antioxidante, son efectivos contra las enfermedades óseas, y circulatorias y el cáncer.

Clasificación de las cervezas

A continuación mostramos una clasificación de las más aceptadas por los fabricantes; una clasificación simple de los tipos de cerveza.

- Cerveza normal: se considera como cerveza normal aquella cuyo extracto seco primitivo no llega al 13%.
- Cerveza especial: es aquella cuyo extracto seco primitivo se encuentra entre el 13 y el 15% en masa.
- Cerveza extra: cuando el extracto seco primitivo no es inferior al 15% en masa.
- Cerveza de bajo contenido en alcohol: es aquella cuya graduación alcohólica se encuentra comprendida en el 1% en volumen.
- Cerveza sin alcohol: aquella cuya graduación alcohólica sea menor del 1% en volumen.
- Cerveza negra: para medir la coloración de la cerveza se utiliza las unidades de color (EBC).

Consumo moderado de alcohol referido a la cerveza

Hay una gran variedad de valores para un "consumo moderado de alcohol", reseñar que el alcohol no afecta a toda la población por igual, esto depende principalmente del índice de masa corporal (IMC).

El Centro de Información Cerveza y Salud se refiere a la ingesta moderada de aproximadamente, de forma general, 10 g de alcohol diarios, lo que equivale a unos 200 ml de cerveza (1 caña), con un contenido alcohólico de 4-5°.

También en numerosos trabajos científicos^{2,3} se recomienda como "consumo moderado de alcohol" 330 ml/día (1 tercio) para mujeres y 660 ml (2 tercios) en el caso de los varones.

La Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) recomienda el consumo de 2 unidades al día (una unidad equivale a 10 g de etanol). Por último, indicar que la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria la recomienda en la base de su pirámide.

Mencionar que en ciertos trabajos científicos internacionales indican valores de entre 20 y 40 g, lo que equivaldría a entre 0,5 y 1 l de alcohol diario, cantidades que, desde nuestro punto de vista, se consideran elevadas.

Por este motivo, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) incluye en la pirámide de la alimentación saludable —principal referencia en materia nutricional de nuestro país— las bebidas fermentadas (cerveza, vino o sidra) de forma opcional y moderada.

Cerveza y salud

La idea inicial sobre la cerveza es que es una bebida que engorda, y no es cierto, con un aporte calórico de 45 kcal/100 ml, y de 17 Kcal/100 ml en la cerveza sin alcohol, su contenido calórico es relativamente bajo. Estudio científico realizados por investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) han constatado que, tras la ingesta de forma moderada —una medida en caso de las

mujeres y dos en el caso de los varones—, no se producía ninguna alteración en el peso⁴.

Pero sin duda alguna la cerveza puede armonizar la salud gracias a determinados componentes como sus flavonoides, es el caso del xantumol, ideal para la lucha y la prevención del cáncer, el cual inhibe la activación metabólica de procarcinógenos, induce la activación de enzimas anticancerígenas e inhibe el crecimiento del tumor en fases tempranas. Además, este flavonoide puede ser un efectivo agente antiinflamatorio, ya que inhibe la síntesis de prostaglandinas a través de las ciclooxigenasas 1 y 2, además de suprimir la expresión de la óxido nítrico sintetasa; su prolongada activación puede generar la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular y reincidir en su actividad antioxidante, ya que *in vitro* el xantumol ha resultado más efectivo que el alfatocoferol en el descenso del marcador de riesgo de lesión o daño tisular, el aminoácido homocisteína. Se concluye que la cerveza, en ingestas moderadas, tiene un mayor efecto antiarteriosclerótico, antiinflamatorio y antitrombótico⁵⁻⁷.

Otro componente muy interesante de la cerveza es la prenilnaringenina, un fitoestrógeno que actúa de forma beneficiosa en el metabolismo óseo aumentando la densidad ósea en población adulta, tanto en varones como en mujeres posmenopáusicas; por lo que es un beneficioso instrumento contra la osteoporosis⁸⁻¹¹.

Así, un metaanálisis de 15 estudios retrospectivos recogía como un descenso de riesgo para diabetes de tipo 2, con una reducción del 30-40% en la población diabética que consumía de 1 a 2 medidas diarias de alcohol, en comparación con población abstemia, por aumento, gracias al alcohol, de la sensibilidad a la insulina^{12,13}.

Además, esta bebida puede actuar como inmunomodulador en población sana por el aumento de leucocitos y de subpoblaciones de linfocitos T, que es más relevante en mujeres que en varones, así como la producción de determinadas citocinas (IL 2, 4, 6, 10, IFN γ y TNF α) y de anticuerpos^{2,3}.

Sin olvidar la característica de sus ácidos amargos procedentes del lúpulo que le confieren el aroma, y que poseen acción sedante. Todos estos componentes beneficiosos para la salud confieren a la cerveza cualidades terapéuticas y, por lo tanto, se podría contemplar la posibilidad de utilizar dicha bebida como un compuesto nutracéutico.

Cerveza y sueño

Hay numerosos productos farmacéuticos que contienen extracto seco de lúpulo junto a tila, melisa y manzanilla, para combatir la ansiedad y el insomnio.

El lúpulo (*Humus lupulus L.*) ha sido utilizado tradicionalmente como planta tranquilizante, su actividad sedante está principalmente en sus ácidos amargos, en particular su componente ácido alfa: 2-Metil-3-buten-2-ol¹⁴⁻¹⁶. El mecanismo de acción de la resina del lúpulo consiste en elevar los valores del neurotransmisor gamma-amino butírico (GABA), inhibidor del sistema nervioso central^{15,17,18}. Cabe indicar que entre estos ácidos amargos sólo los ácidos alfa son los que tienen mayor actividad sedante; aunque su proporción es más baja frente a los ácidos beta.

Además, debemos mencionar que hay otro componente aromático que se encuentra en la cerveza, el mircenol¹⁷, modulador positivo de los receptores GABA y, por lo tanto, también con efecto sedante, así, esta bebida puede paliar las alteraciones del sueño¹⁵.

No podemos olvidar el trabajo realizado por Schellenberg et al¹⁹, que estudian el efecto del lúpulo y la valeriana en el mecanismo central de la adenosina y observan un incremento de las ondas alfa en EEG, generado por los receptores de adenosina inductores del sueño.

Así también, ciertos autores contemplan la posibilidad, aún no demostrada, de que a través de la melatonina existente en la cerveza también se podría justificar la acción inductora del sueño por esta indolamina^{20,21}.

En resumen, hay numerosos componentes en la cerveza que pueden albergar la capacidad de encarrilar el ritmo del sueño, además de favorecer su inducción.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer su colaboración al Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

Bibliografía

1. Posada J. Estudio recopilatorio Cerveza y salud. Escuela Superior de Cerveza y Salud; 1998.
2. Romeo J, Warnberg R, Diaz LE, Gonzalez-Gross M, Marcos A. Effect of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem.* 2007;63:153-9.
3. Romeo J, Warnberg J, Nova E, Ligia E, González-Gros, Marcos A. Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann Nutr Metab.* 2007;51:359-66.
4. Romero J, Gonzalez-Gross M, Warnberg J, Diaz LE, Marcos A. Does beer have an impact on weight gain? Effects of moderate beer consumption on body composition. *Nutr Hosp.* 2007;22:223-8.
5. Monteiro R, Calhau C, Oliveira e Silva A, Pinheiro-Silva S, Gue-reiro S, Gartner F, et al. Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J Cell Biochem.* 2008;104:1699-707.
6. Magalhaes PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun.* 2009;4:591-610.
7. Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry.* 2004;65:1317-30.
8. Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, Rong H, et al. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen 8-prenylnaringenin. *Reproduction.* 2002;123:235-42.
9. Rosenblum ER, Campbell M, Van Thiel D, Gavalier JS. Isolation and Identification of Phytoestrogens from Beer. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17:1207-9.
10. Tucker KL, Jugdaohsing R, Powell JJ, Qiao Nigh, Hannan MT, Sripanyakorn S, et al. Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1188-96.
11. Pedrera JD, Lavado JM, Roncero R, Calderon J, Rodríguez T, Canal M. Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition.* 2009;25:1057-63.
12. Klatsky AL. Alcohol, cardiovascular diseases and diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2007;55:237-47.

13. Imhof A, Plamper I, Maier S, Trischler G, Koenig W. Effect of drinking on adiponectin in healthy men and women. *Diabetes Care*. 2009;32:1101-3.
14. Hansel R, Wohlfart R, Coper H. Sedative-hipnotic compounds in the exhalation of hops, II. *Z Naturforsch C*. 1980;35:1096-7.
15. Zanolli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus L*. *J Ethnopharmacol*. 2008;116:383-96.
16. Weeks BS. Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian. *Med Sci Monit*. 2009;15:256-62.
17. Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Sheikh Julfikar H, Koda H, et al. Effects of beer and hop on ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. *J Agric Food Chem*. 2006;54:2514-9.
18. Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia R, et al. Evidence the B-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J Ethnopharmacol*. 2007;109:87-92.
19. Schellenberg R, Sauer S, Abourashed E, Koetter U, Brattstrom A. The fixed combination of valerian and hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med*. 2004;70:594-7.
20. Maldonado M, Moreno H, Calvo JR. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clin Nutr*. 2009;28:188-91.
21. Kotronoulas G, Stamatakis A, Stylianopoulou F. Hormones, hormonal agents, and neuropeptides involved in the neuroendocrine regulation of sleep in humans. *Hormone*. 2010;8:232-48

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de las siguientes entidades:

- Ayuda del programa propio de la UEx para el grupo de investigación “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” (PPGRU12L2; Orgánica 2012-18L200)

- Gobierno de Extremadura: Apoyos a los planes de Actuación de los grupos catalogados para el grupo de investigación “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” (GR10003)

- Plan de Iniciación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la UEx. Acción VII 2011.

-Centro de Información Cerveza y Salud: “Beca Manuel de Oya”

GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

“Una manera de hacer Europa”



