Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efectes del dipiridamol sobre l'activitat motora del rèptil *Gallotia galloti*

Antònia Arrom Coll

Grau de Biología

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43149965X

Treball tutelat pels doctors Rubén V. Rial Planes i Gaspar Alemany Mandilego

Departament de Biologia

[X] S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:
Rèptil, dipiridamol, sèrum salí, intacte, vigília, REN, NREM, distancia recorreguda, temps desplaçament i temps de gratat.

Índex

Resum 2
Introducció 3
L'evolució del son 4
La transició del son: rèptils i mamífers 5
L'adenosina 6
El dipiridamol 7
Hipòtesi del treball 8
Objectius 8
Material i Mètodes 8
Resultats 12
Discussió 16
Conclusions 18
Agraïments 18
Bibliografia 19

Resum

En aquest estudi es pretén aportar evidencies a favor o en contra de l'existència de homologia filogenètica entre la fase de comportament actiu dels rèptils i el son dels mamífers. Per l'obtenció d'aquestes evidencies es va avaluar el paper que juga el dipiridamol en l'activitat motora de les sargantanes mitjançant les mesures de la distància recorreguda per desplaçament, temps de desplaçament i temps de gratat. Per dur a terme l'estudi es van fer servir 12 sargantanes adultes de l'espècie *Gallotia galloti* amb un pes mitjà de 30 grams de sexe i edat indeterminats. Cada individu es va sotmetre a tres tractaments: intacte, sèrum salí (9 g de ClNa/l) i solució amb dipiridamol (2 µg/g). El registre dels diferents tractaments es va dur a terme durant 3 setmanes successives i es va alterar l'ordre dels tractaments per tal de garantir la absència total d'efectes residuals en els resultats. Cada animal va ser estudiat durant 4 hores i es va fer servir una càmera web que gravava la activitat dels animal. El posterior anàlisis de l'activitat motora de les sargantanes es va fer mitjançant el programa informàtic Image J. Pel que fa els resultats obtinguts no han aportat evidències significatives de que el fàrmac hagi produït cap efecte significatiu. Per tant, la hipòtesis de homologia filogenètica entre la vigília dels rèptils i el son REM dels mamífers rep suport.

Paraules clau. Rèptils, dipiridamol, vigília, son, activitat motora, evolució del son, comportament de gratat.

Abstract

This study aims at finding evidence for or against the existence of phylogenetic homology between the phase of active behaviour in reptiles and the sleep in mammals. For this purpose, we have studied the consequences of administering dipiridamole, a blocker of the brain adenosine recapture, on the motor activity of lizards, measuring the distance travelled, the travelling time and the time spent in ground scratching have been evaluated. Twelve adult *Gallotia galloti* lizards with an average weight of 30 grams and undetermined age and sex were used. Each animal received three successive treatments: intact, 0.5 ml of saline serum (9 g de ClNa/l) and a 0.5 ml solution with dipiridamole (2 µg/g) in saline. One week elapsed between the different treatments and their order was randomized to guarantee the total absence of residual effects between treatments. The behavior of each animal was recorded during 4h after treatments with a web camera. The analysis of the motor activity was carried off line using the Image J software. The administration of dipriridamole cauused no effect on the activity of the animals and the difference between the three groups was non significant. As a result, the phylogenetic homology between the reptilian wakefulness and the mammalian sleep receives support.

Key words. Reptiles, dipiridamole, wakefulness, sleep evolution, motor activity, scratching behavior.

Introducció

El son és un estat de consciència que s'observa en la majoria dels animals, el qual depenent de l'espècie i l'edat presenta unes característiques determinades. En el cas del regne animal, el son pot ser reconegut per l'aspecte extern de l'organisme adormit.

En una primera aproximació, el son se podria definir com l'absència de comportament, definició que és complementa amb altres trets: repòs motor, llindars sensorials elevats, reversibilitat, posició corporal estereotipada, recurrència circadiària i estat regulat en el qual no és difícil reconèixer "fam" i "sacietat" de son. Tots els trets esmentats són, d'alguna manera obvis, però l'últim revesteix especial importància ja que gràcies en aquest es pot dir que el son compleix una funció necessària, tal com menjar i beure [Rial et al., 2007a; Rial et al., 2010].

La seva importància encara s'està estudiant, no obstant, el tractar-se d'un estat en el qual l'organisme esta indefens davant les amenaces ambientals fa pensar que aquest tal vegada té alguns avantatges ocults. Algunes de les hipòtesis més contemplades sobre el son són les següents:

- L'organisme necessita reconstruir i reparar les conseqüències del desgast que indubtablement es produeix durant la vigília [Adam, 1980]. En aquest cas se recorreria el son ja que vindria a ser un estat de repòs en què tota energia estaria disponible per les reparacions, ja que no es durien a terme altres tasques. No obstant estudis demostren que el cervell durant el son sovint es troba més actiu que durant la vigília, descartant així la hipòtesis anterior.

- El son REM serviria per a la consolidació de l'aprenentatge i la memòria [Cipolli, 2005]. Aquesta hipòtesis seria acceptada si els animals que presenten una capacitat d'aprenentatge superior, com l'home i el dofí, presentessin una major proporció de son REM, fet que no passa. De la mateixa manera, l'ornitorinc, animal que presenta la major proporció de son REM, tindria una gran capacitat d'aprenentatge i/o memòria, cosa que de nou no es compleix [Siegel et al., 1997, 1998, 1999].

Com aquestes, hi ha altres hipòtesis que també cerquen trobar explicació del perquè de el son, no obstant, no és una tasca tan senzilla. El fet que aquest hagi arribat fins

l'actualitat fa pensar que el son va aparèixer en algun animal durant l'escala evolutiva aportant-li algunes avantatges que el van potenciar enfront de la resta d'animals que no dormien. Per tant, una possibilitat a l'hora d' esbrinar la importància del son seria retrocedir els inicis d'aquest abans de la seva evolució per saber quins van ser aquests avantatges adaptatius que ho va fer perdurar, esbrinant així, la seva funció [Rial et al., 2007a; Rial et al., 2010].

L'evolució del son

Una teoria que intenta explicar la forma en que va aparèixer el son es la proposta pel grup d'investigadors de neurofisiologia del son de la Universitat de les Illes Balears (UIB). D'acord amb aquesta teoria, el son va aparèixer com a conseqüència de la transformació dels rèptils en mamífers.

La fase activa dels primitius rèptils estava lligada a la fase lluminosa del fotoperíode, donada la seva necessitat del calor solar. Però, durant el període juràssic, un grup de petits rèptils van ser capaços de estendre la seva activitat a les primeres hores de la nit, donant com a resultat un incrementant del seu metabolisme energètic. D'aquesta forma van ocupar un nínxol ecològic pràcticament lliure de competidors i de depredadors.

La invasió de la nit va forçar la aparició d'importants canvis en els sistemes sensorials i als seus control cerebrals [Menaker et al, 19xx, Aboitiz, 19xx]. En particular van haver de incrementar la capacitat olfactiva, per tal de reconèixer el l'ambient en condicions de foscor. Aquest increment va venir acompanyat d'un augment considerable de mida i de les connexions telencefàliques. Per altra banda, aquelles pre-mamífers van haver d'adaptar la visió a les condicions escotòpiques de la nit. L'augment de la sensibilitat visual va fer que la exposició a la intensa llum diürna es tornés perillosa i de fet, la retina del mamífers nocturns actuals, com la rata, sofreixen importants lesions a la retina quan són exposats a llum d'una intensitat tan baixa com 270 lux [Semple-Rowland i Dawson 1987]. Aquest perill va forçar a aquells primitius mamífers a romandre ocults en els seus caus i amb els ulls closos. D'aquesta forma, la antiga vigília dels rèptils va convertir-se en un estat d'immobilitat diürna amb ulls closos i ocults en els caus. Es a dir: el son [Rial et al, 2010].

Per altra banda, el desenvolupament del telencèfal va permetre l'aparició d'un nou tipus de vigília, la vigília telencefàlica i la consciència. Aquesta sèrie de modificacions explica el fracàs en la recerca dels trets de son en els rèptils; en realitat, els rèptils tenen repòs circadiari forçat per la seva dependència el calor solar, però autèntic son amb els trets neurològics que caracteritzen el son dels mamífers [Rial *et al.*, 1993; Nicolau *et al.*, 2000; Rial et al, 2010].

La transició del son: rèptils i mamífers

En animals més simples, com els rèptils, únicament es distingeixen cicles d'activitat i repòs, que són els més universals per a tots els organismes. No obstant, la complexitat d'aquets cicles varia depenent de la complexitat de l'animal. Els estudis realitzats en mamífers i aus ha obert noves portes sobre a què es deguda la complexitat del son d'aquests animals i el seu origen. Atenent això, es proposa que la complexitat del son en els mamífers no sigui més que el resultat evolutiu de l'augment de la complexitat cerebral i en particular, de l'escorça.

L'aparició de l'escorça va suposar, juntament amb la termoregulació, la independència de l'organisme enfront de l'ambient i amb això, la necessitat d'una reorganització cerebral per a un nou tipus de vigília controlada des de l'escorça. Així va poder haver-se aconseguit la repartició del temps en dues fases, una d'activitat i una altra de repòs.

Aquest enfocament suposa que el son dels mamífers es tracta del residu evolutiu de la vigília dels rèptils [Rial *et al.*, 1993; Nicolau *et al.*, 2000]. Aquesta hipòtesi afirma que la vigília cortical dels mamífers és un nou estat evolutiu, atès que els rèptils no presenten escorça. Probablement tot va començar amb un mamífer primitiu que disposava de dos tipus de vigília: la reptiliana primitiva, controlada per estructures subcorticals, i la mamífera moderna, controlada per la escorça telencefàlica. Aquest mamífer pogué suprimir la vigília reptiliana primitiva incorporant-la amb el repòs circadiari, obtenint així un cicle de vigília controlat per la escorça telencefàlica i un cicle de repòs circadiari controlat des de el tonc de l'encèfal.

Els rèptils actuals presenten dues fases en la vigília: una, en què l'animal s'esforça a mantenir una temperatura corporal adequada mitjançant heliotermia-tigmotermia i una altra, en què l'animal activament explora el medi, s'alimenta, busca parella, etc. En el primer cas dominen clarament les funcions de control homeostàtic, de domini

parasimpàtic; mentre que, en el segon cas, amb domini simpàtic, se permet el seu abandonament durant un temps. Aquestes característiques es complementen amb la hipòtesi mencionada anteriorment, tenint així que el son dels mamífers és homòleg a la vigília dels rèptils. Per tant, tenim que la vigila del rèptils amb domini parasimpàtic es converteix amb el son NREM dels mamífers i la vigila del rèptils amb domini simpàtic es converteix amb el son REM dels mamífers.

En termes neurològics, la aparició del son de tipus mamífer també va forçar el desenvolupament de una sèrie de mecanismes per bloquejar l'aparició de la vigília reptiliana durant les hores de llum. Aquest avanç va ser el resultat de la creació del que s'ha anomenat el "flip-flop" hipotalèmic, un commutador que impedeix l'aparició d'estats intermedis entre vigília i son. Per tant, l'organisme només pot estar dormit o despert. Aquest mecanisme ve esser postulat per Lu et al (2006) y la seva activitat depèn de les interaccions entre tres neurotransmissors: les oxexines-hipocretines, la histamina i, sobre tot, l'adenosina. La importància de l'adenosina en aquest treball queda demostrada pels efectes dipiridamol, un dels seus agonistes.

L'adenosina

L'adenosina és un nucleòsid endogen format per la combinació d'una base púrica, l'adenina, i un sucre, i D - ribosa. Es caracteritza per la seva importància a nivell terapèutic del miocardi i del cervell, on té el paper principal de neurotransmissor inhibidor [Hernan,P et al, 2006].

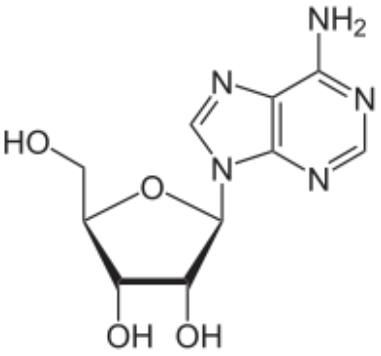

Figura 1. Estructura de l'adenosina

Aquesta és generada en grans quantitats durant la vigília com a conseqüència de la degradació del ATP. Aquesta adenosina arriba el nucli ventro-lateral preòptic del hipotàlem (VLPO) on s'estimula la producció de gaba i s'inhibeix la producció de

histamines i orèxies. Els tres efectes anteriors posen en marxa el son per un mecanisme “flip-flop” que com s’ha mencionat anterior impedeix la aparició dels estats intermedis entre vigília-son. [Salín-Pascual, R.J., 2004].

El seu metabolisme comença amb la desfosforilació del ATP a AMP per el nucleòtid trifosfat hidrolasa, el qual posteriorment es desfosfori-la a adenosina per l’acció del enzim ecto-5’-nucleotidasa. Llavors l’adenosina difon a l'espai intersticial de les cèl·lules endotelials de les artèries coronàries o l'espai neuronal intersinàptic, per unir-se a algun dels subtipus de receptors específics (A_1-A_3) [Klabunde, RE.,1983].

Aquests es classifiquen en dos receptors d’alta afinitat, els receptors A_1 y A_{2A} , i dos de baixa afinitat, A_{2B} y A_3. Aquets receptors poden ser activats o bloquejats per diferents substancies depenent de si es pretén estimular o inhibir l’acció de l’adenosina. En aquest estudi es centrarà l’atenció els receptors A_2 , sobre els quals actua el dipiridamol un agonista de l’adenosina. [Costenla, A. R., 2010].

El dipiridamol

El dipiridamol és un fàrmac agonista de l’adrenalina que actúa sobre els receptors A2 perllongant el temps de permanència de la adenosina a l'espai intersticial. El resultat és la duplicació dels nivells d’adenosina endògena en circulació, potencialitat així les accions vasodilatadores i broncodilatadores [Kaputlu et al. 1998]. També, inhibeix la recaptació cel·lular de l’adenosina en les plaquetes, glòbuls vermells i les cèl·lules endotelials que condueixen a un augment de les concentracions extracel·lulars de l’adenosina [Marrón et al. 2015].

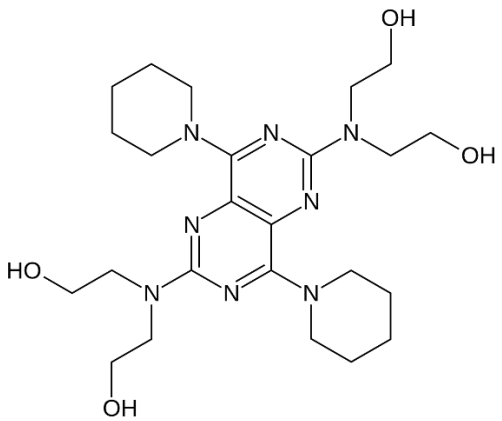

Figura 2. Estructura del dipiridamol.

Hipòtesi del treball

Tot i que la relació de l'adenosina amb la vigília i el son pot ser més complexa de lo previsible, seria de gran interès estudiar els efectes dels seus agonistes i antagonistes sobre els poiquiloterms i, d'acord amb la hipòtesi que el son dels mamífers és equivalent a la vigília dels rèptils, hi ha la possibilitat que l'adenosina hipotalèmica no produeixi vigília en els rèptils, un resultat diametralment oposat al conegut en els mamífers. Aquest efecte es confirmaria si el dipiridamol, com agonista de la adenosina, no tingués efecte incrementant el son.

Objectius

Objectiu general

Aportar evidències a favor o en contra de l'existència de homologia filogenètica entre el comportament actiu dels rèptils i el son dels mamífers.

Objectius experimentals

- Registrar l'activitat/moviment d'un grup de sargantanes *Gallotia galloti* sotmeses a diferents estímuls mitjançant una càmera de vídeo.
- La resposta enregistrada en els animals anteriors serà comparada amb les registrades en els mateixos animals després de rebre una dosis de sèrum i dipiridamol.
- Si el dipiridamol manca d'efectes reduint l'activitat en les sargantanes en comparació als controls rebent sèrum salí, la hipòtesis d'equivalència entre el son dels mamífers i el comportament actiu dels rèptils rebrà suport.

Material i Mètodes

Animals

Es van utilitzar 12 sargantanes de l'espècie *Gallotia galloti* (Família Lacertidae, Ordre Squamata), adults d'un pes mitjà de 30 grams de sexe i edat indeterminats.

Les sargantanes foren capturades a la zona de Guimar, al nord-oest de l'illa de Tenerife, sota l'autorització pertinent del Govern Autonòmic Canari. Per dur a terme la

seva captura es van utilitzar llaunes a manera de trampes i com a esquer trossos de tomàtiga.

Material i condicions de manteniment

Les sargantanes es van mantenir dins un terrari de 30 x 40 cm amb il·luminació artificial (12 hores llum/12 hores obscuritat) simulant les condicions del seu hàbit natural. La dieta es va basar amb aigua i purés infantils de fruita, verdura i pollastre.

Durant les 4 hores del registre, les sargantanes, es van mantenir dins un terrari de 30 x 40 cm amb il·luminació artificial. El terrari estava folrat per fora amb paper per evitar que el comportament de les sargantanes fos influenciat per senyals visuals externes.

L'experiment es va dur a terme en una sala aïllada del laboratori de fisiologia d'uns 4 X 6 m^2 aproximadament amb una temperatura ambiental de 22 ± 2 ºC. Al ser una sala aïllada es va evitar l'acció d'agents externs sonors i visuals que puguin pertorbar l'activitat motora de les sargantanes.

El terrari es trobava sobre una taula, el seu damunt hi havia un llum d'uns 35 watts per facilitar la identificació de les sargantanes durant la anàlisis dels registres. A més, per facilitar la identificació d'aquestes es va utilitzar un substrat format per pedres d'un color blanquinós que contrastes amb el color fosc de les sargantanes.

Finalment, per dur a terme la identificació de les sargantanes es va realitzar una marca blanca identificativa amb l'ajuda d'un corrector.

Tractaments

Cada sargantana va ser sotmesa a tres tractaments: intactes, sèrum salí i solució amb dipiridamol. De tal manera que, cada sargantana va ser utilitzada com a control de si mateixa per minimitzar la presència de possibles errors. Els animals control intactes no van sofrir cap manipulació. Un segon grup control va rebre solució intraperitoneal de 0'5 ml de sèrum salí (9 g de ClNa/l) i el grup experimental va rebre una injecció intraperitoneal de dipiridamol.

La dosi oral aproximada de dipiridamol en els éssers humans és de 2mg/kg de pes corporal o, lo que és el mateix, 2 µg/g. Donada la inexistència d'estudis previs sobre

l'administració de dipiridamol en animals no mamífers, es van utilitzar dosis similars a les emprades en humans. Així doncs, tenint en compte que les sargantanes tenen un pes corporal mitjà de 30g, cada animal hauria de rebre una quantitat de 2 x 30 = 60µg de dipiridamol per via intraperitoneal dissolt en un volum de 0'5 ml o, el que és el mateix, 0'5 ml de una solució de 120µg/ml. D'acord amb aquestes xifres, es va preparar una dissolució de 250 ml de sèrum salí en la qual s'havien dissolt un total de 120 x 250 = 30000µg de dipiridamol que va resultar en una dissolució de 30000µg/250ml o també 30mg/250ml de dipiridamol. Donada l'escassa variació en el pes dels animals i la dificultat en la precisió del volum injectat, tots els animals van rebre dosis pràcticament iguals, pel que no es va tenir en compte les variacions individuals en el pes de cada animal.

Les sargantanes van ser enregistrades en grups de tres durant tres setmanes successives, de les quals, un dia van rebre el tractament, però no van sofrir cap manipulació durant els sis dies restants de la setmana. S'estimà que aquests sis dies sense tractament permetrien que els efectes de la injecció fossin dissipats abans de començar el següent experiment. Però, per una precaució suplementària i per tal de garantir l'absència total d'efectes residuals en els resultats, l'orde dels tres tractaments va variar cada setmana. Així, el primer grup de tres animals va ser estudiat amb l'ordre intacte-salí-dipiridamol (ISD), el segon amb l'ordre SDI, el tercer amb l'ordre DIS i en el quart es va repetir el primer ordre (ISD). L'organització experimental així descrita queda representada en la figura següent:

Setmana 1							Setmana 2							Setmana 3						
DI	DM	DX	DJ	DV	DS	D	DI	DM	DX	DJ	DV	DS	D	DI	DM	DX	DJ	DV	DS	D
I_1	S_2	D_3	I_4				S_1	D_2	I_3	S_4				D_1	I_2	S_3	D_4			

En la qual I1, I2 I3 i I4 són els quatre grups de tres animals intactes, S1, S2, S3, i S4 els quatre grups que reberen sèrum salí D1, D2, D3, i D4 els quatre grups que reberen dipiridamol.

Procediment experimental

Durant cada registre s'introduïen els tres individus d'un mateix grup dins els terrari i es posava en funcionament la càmera web la qual gravava un vídeo a intervals de vint-i-

cinc imatges per segon. La càmera va romandre connectada a un ordinador portàtil durant les 4 hores del registre, durant les quals es gravava el comportament dels animals.

Un cop gravades les imatges, es va realitzar l'anàlisi de l'activitat motora de les sargantanes utilitzant el programa informàtic Image J. Es va anotar la distància de cada desplaçament, el temps que durà el desplaçament i el temps de gratat per cada animal. Per l'obtenció d'aquestes dades es va tenir en compte el moment d'inici i final de cada moviment considerant que dos moviments eren independents si entre ells hi havia un lapse de temps superior a dos segons. Si els intervals eren menors a dos segons, els moviments successius es van sumar. A més a més, també es va comptabilitzar el temps que els animals grataven el trespol del terrari .

Per l'obtenció de les distàncies recorregudes durant un període de temps es va fer servir una eina del programa esmentat anteriorment, Image J, la qual mesura els píxels entre les dues imatges i les converteix amb distàncies reals mitjançant una conversió. El temps es va mesurar en segons i les distàncies en centímetres prenent com a referència del trajecte la punta del musell de la sargantana.

Anàlisi estadístic

Els resultats obtinguts van ser analitzats de dues maneres diferents. Per una part, es va fer un mitjana per animal de les diferents variables: temps que dura el desplaçament, distància de cada desplaçament i temps de gratat. Per analitzar si hi havia diferències significatives entre els diferents tractaments es va fer una ANOVA d'un factor emprant com variable dependent la distància recorreguda per l'animal i els tractaments com variables independents. A més a més, es va fer una altre ANOVA de dos factors amb la distància recorreguda per cada animal i el temps de durada del moviment com variables dependents i els tractaments com variables independents. Aquest anàlisi es va completar amb un "post hoc" emprant el test de Fisher per determinar les diferències entre tractaments. En tots els casos, els resultats es van representar com gràfics de barres amb barra de desviació típica.

Resultats

Els resultats obtinguts s'han dividit en tres seccions. En la primera s'exposa el temps en el qual l'animal està en desplaçament; en la segona, la distància recorreguda per l'animal; en la tercera, el temps en el qual l'animal està gratant.

Temps en el qual l'animal està en desplaçament

El temps dedicat el desplaçament es veu representat a la Figura 3 i 4. En la Figura 3 s'observen les diferències entre les mitjanes del temps dedicat el desplaçament enregistrats després dels tres tractaments i durant les quatre hores del estudi. El sèrum sali va produir uns resultats un 0'35% més elevats que als animals intactes i un 14'76% superior que el tractament en dipiridamol, però les diferències, no van ser significatives (F = 0'2863, p(2, 11)= 0'753) (ns).

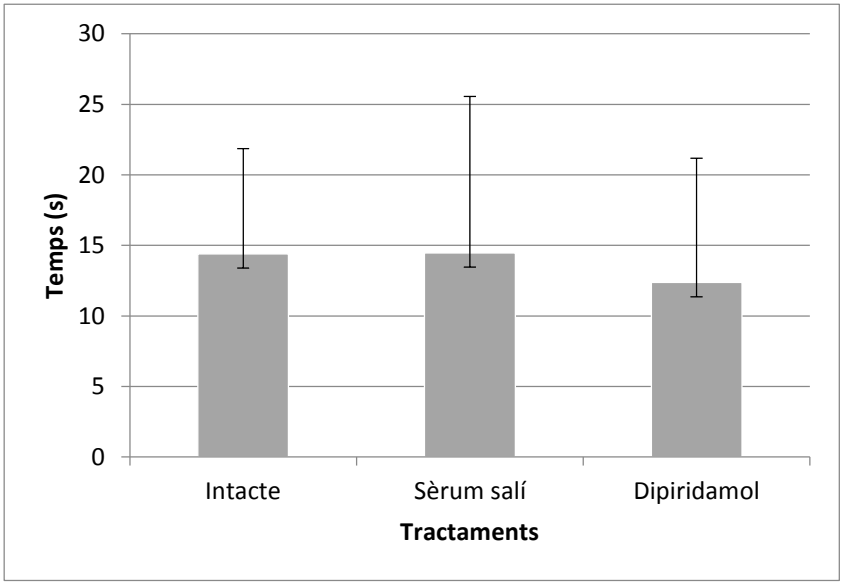

Figura 3. La mitjana del temps en la qual l'animal està en desplaçament.

En la Figura 4 venen representades les diferències entre les mitjanes per hores dels diferents tractaments, obtenint que, independentment del tractament el temps dedicat el desplaçament va disminuint a mesura que passen les hores. Pel que fa els tractaments no hi ha evidències significatives que aquests siguin diferents entre si en cap dels casos. (F = 0'1252, p(2, 11)= 0'9931) (ns).

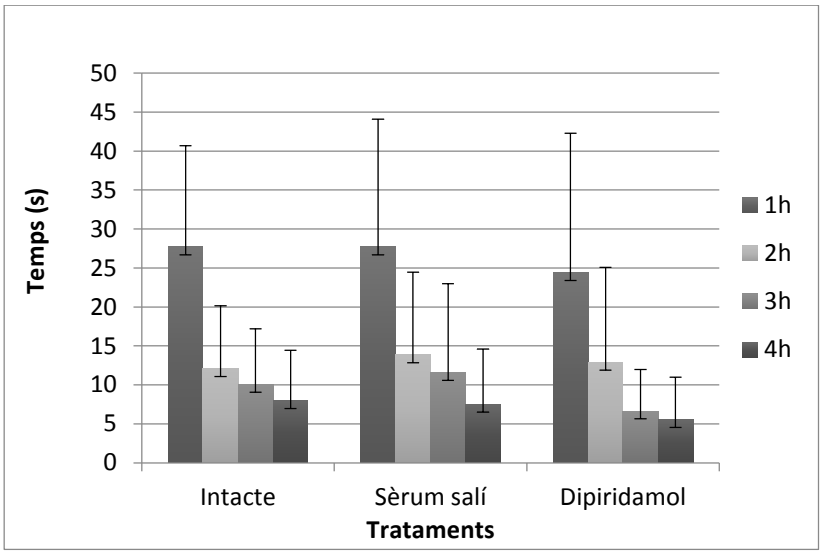

Figura 4. La mitjana del temps per hores en la qual l'animal està en desplaçament.

Distància recorreguda per l'animal

La distància recorreguda per l'animal es veu representada a les Figures 5 i 6. En la Figura 5 s'observen les diferències entre les mitjanes dels desplaçaments enregistrats després dels tres tractaments i durant les quatre hores de l'estudi. El tractament intacte va produir un resultats un 18'98% més elevats que el tractament amb sèrum salí i un 62,32% superior que el tractament en dipiridamol, però les diferències no van ser significatives (F = 1'866 p(2, 11)= 0'171) (ns).

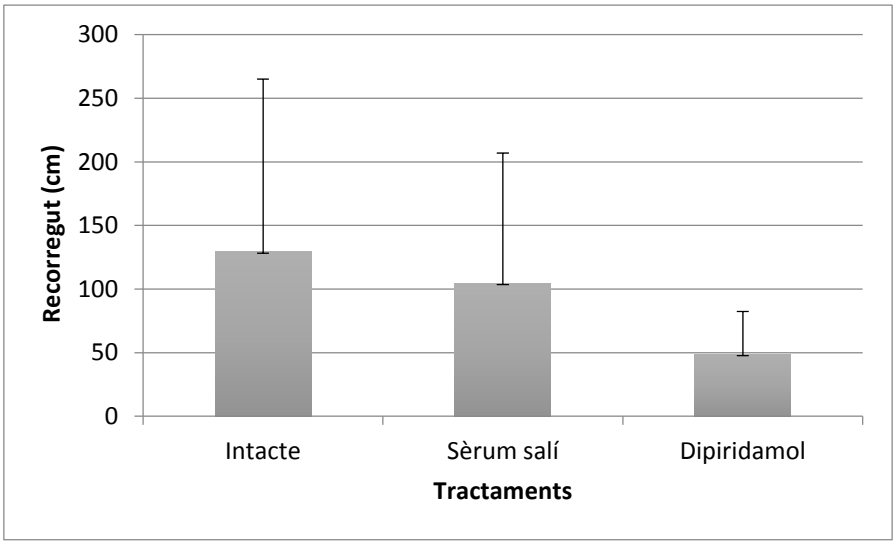

Figura 5. Distància mitjana recorreguda pels animals

En la Figura 6 venen representades les diferències entre les mitjanes per hores dels diferents tractaments, obtenint que independentment del tractament el temps dedicat el desplaçament va disminuint a mesura que passen les hores. Pel que fa els tractaments no hi ha evidències significatives que aquests són diferents entre sí en tots els casos, excepte en la primera hora, en la qual els animals sotmesos al tractament intacte presenten un major desplaçament que els sotmesos els altres tractaments (F = 1'955, p(2, 11)= 0'0766) (ns).

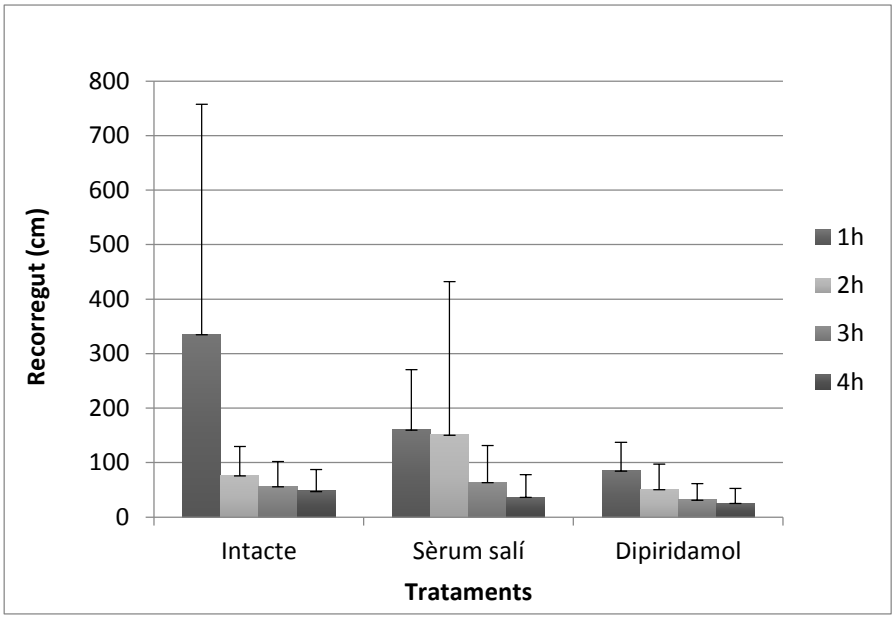

Figura 6. Distància mitjana per hores recorreguda per l'animal

Temps en el qual l'animal està gratant

El temps de gratat es veu representat a la Figura 7 i 8. En la Figura 7 s'observen les diferències entre les mitjanes dels temps de gratat enregistrats després dels tres tractaments i durant les quatre hores del estudi. El tractament intacte va produir un resultats un 4'93% més elevats que el tractament amb dipiridamol i un 3'67% superior que el tractament en sèrum salí; però les diferències no van ser significatives (F = 0'047, p(2,11)= 0'9545) (ns).

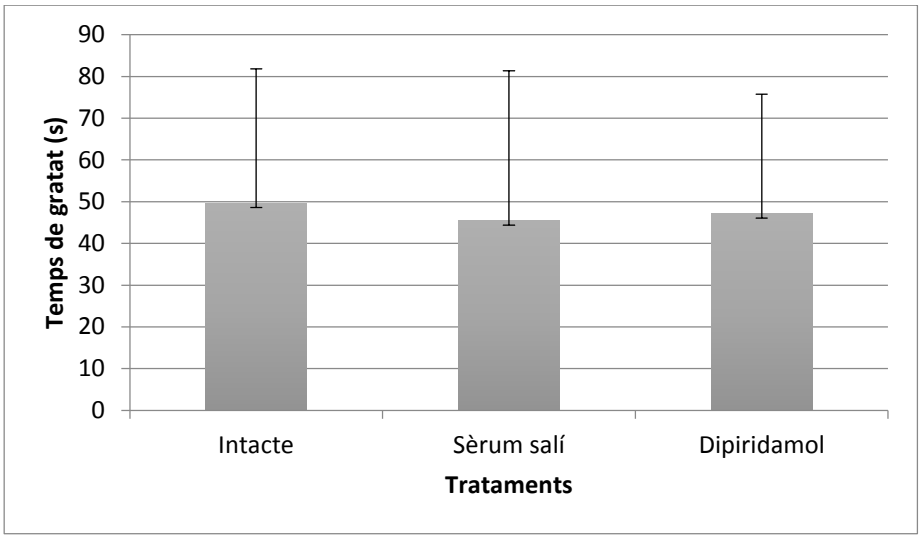

Figura 7. La mitjana del temps en la qual l'animal està gratant.

En la Figura 8 venen representades les diferencies entre les mitjanes per hores dels diferents tractaments, obtenint que independentment del tractament el temps dedicat a gratar va disminuint a mesura que passen les hores. Pel que fa els tractaments no hi ha evidències significatives que aquests siguin diferents entre si en cap dels casos (F = 0'3386, p(2,11)= 0'9154) (ns).

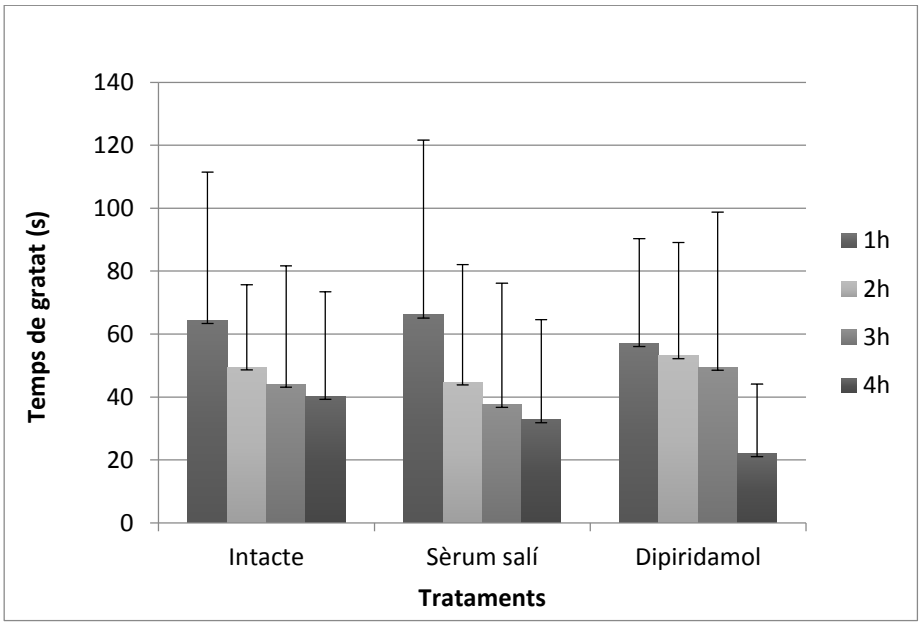

Figura 8. La mitjana del temps per hores en la qual l'animal està gratant.

Discussió

El present treball es proposava comprovar si el dipiridamol tenia alguna activitat incrementant algun tret relacionat amb el son en la sargantana *Gallotia galloti*. El dipridamol és un fàrmac que produeix somnolència als mamífers degut a la seva activitat com bloquejador de la recaptació de adenosina al nucli ventromedial de l'hipotàlem que, como resultat net, incrementa la quantitat d'adenosina disponible al cervell. Donat que els augments de adenosina hipotalàmica indueixen el son fisiològic als mamífers, si el dipiridamol tingués el mateix efecte en les sargantanes, el son dels rèptils seria homòleg amb el son dels mamífers. En el cas contrari, si manqués d'efectes, s'hauria de concloure que el son dels mamífers i el dels rèptils no tenen cap relació.

En termes metodològics, s'ha de reconèixer que el present treball no ha estudiat el son d'una forma directa, tal com s'hauria fet a un mamífer, al qual s'haurien implantat elèctrodes cerebrals i s'haurien estudiat els efectes del dipiridamol sobre l'EEG, la activitat muscular o el moviment dels ulls, tal com es fa en una polisomnografía clàssica. Però, també, és ben clar que la mobilitat corporal és una bona aproximació a l'estudi de la vigília. Aquest fet és més important si es considera que el fàrmac emprat, el dipiridamol indueix el son, per la qual cosa, la cerca del son a un animal que suposadament hauria de mostrar més son, produiria uns resultats no tan clars com els que el treball esperava obtenir que eren una disminució en la seva vigilància, demostrada per una reducció en la activitat motora general dels animals desperts

També en aspectes metodològics, la dosi de dipiridamol emprada està justificada en part pels efectes hipnòtics observats quan la mateixa dosi és administrada als éssers humans. Però al mateix temps, s'ha de comprendre que el metabolisme dels rèptils és molt reduït quan és comparat amb el dels mamífers. Aquest fet hauria de tenir conseqüències en els efectes del fàrmac. En primer lloc, quan és administrada oralment, l'absorció del fàrmac en un ésser viu amb un metabolisme reduït, també podria estar molt minvada. Aquest problema s'ha resolt al emprar la via intra-peritoneal que, en la pràctica, és la més semblant a la oral amb la única diferència que redueix el temps de transport al tub digestiu i també la absorció. El resultat d'aquesta via d'administració es podria traduir en uns efectes més ràpids del fàrmac que haurien de contrarestar la reducció que es podria esperar a un animal de metabolisme lent.

Però els resultats mostren que el fàrmac no ha produït cap efecte significatiu. De forma molt clara, ni la distància recorreguda, ni el temps emprat, no tampoc la activitat de gratat, han sofert cap modificació després de la administració del fàrmac. A més a més, el perfil temporal d'aquests tres paràmetres no s'han modificat. Si el fàrmac hagués produït algun efecte, s'hauria d'haver observat algun canvi en la evolució temporal dels paràmetres estudiats.

Per altra banda, s'ha de tenir en compte que el present treball és, només una part d'un projecte més ambiciós. Per una part, dos treballs de fi de grau que se presenten en aquesta mateixa convocatòria han estudiat els efectes de la cafeïna sobre 1) l'activitat nerviosa de la mateixa espècie i 2) sobre els mateixes paràmetres estudiats en el present treball. En ambdós casos, la cafeïna no ha produït cap canvi significatiu. Ha de notar-se que la cafeïna hauria de produir efectes oposats als del dipiridamol. Donat que ni el bloquejador de la recaptació, que hauria de potenciar els efectes de la adenosina, ni la cafeïna que els inhibeix, han produït cap efecte. La conclusió obvia és que la adenosina no té funció en el control del son en els rèptils.

Els resultats d'aquests tres treballs són importants per vàries raons. En primer lloc, tots tres treballs constitueixen la primera aproximació mai feta a l'estudi dels efectes de la adenosina en la activitat dels rèptils. En segon lloc, la coincidència en els resultats dels tres treballs és una prova molt significativa de l'absència d'homologia entre el que s'ha considerat el son dels rèptils i que a partir d'ara, s'haurà de reconèixer que no és més que inactivació tèrmica. Si un rèptil sembla estar dormint, la veritat és que el seu estat no és més que una inactivació produïda per les baixes temperatures del seu cos i també, probablement, pel ritme circadiari de activitat-repòs, ben conegut a aquest grup [Underwood, 1992]. En conclusió, s'ha de reconèixer que els rèptils no tenen vertader son i la hipòtesi sobre la evolució del son que proposa la homologia entre la vigília dels rèptils i el son dels mamífers, mantinguda pel grup de recerca del son i els ritmes circadiaris de la Universitat de les Illes Balears, rep suport.

Limitacions

La major limitació d'aquest estudi resideix en haver estudiat només una dosi única de dipiridamol. Per tal d'aconseguir una major certesa, l'estudi s'hauria de completar amb dosis superior de dipiridamol

Conclusions

- S’ha trobat una clara evidència afavorint l’existència de homologia filogenètica entre la vigília dels rèptils i el son dels mamífers.

Agraïments

He d'agrair l'ajuda i suport de l'equip de Fisiologia del son i els Ritmes Circadiaris, del Departament de Biologia de la UIB, especialment a Rubén V. Rial, Gaspar Alemany Mandilego, Mª Cristina Nicolau i Mourad Akaarir El Ghourri.

Bibliografia

- Aboitiz, F., Montiel, J., Morales, D., & Concha, M. (2002*). Evolutionary divergence of the reptilian and the mammalian brains: considerations on connectivity and development.* Brain research reviews, 39(2), 141-153.
- Adam, K. (1980).*Sleep as a restorative process and a theory to explain why.* Progress in Brain Research, 53: 289-305.
- Antle, M. C., Steen, N. M., & Mistlberger, R. E. (2001). *Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster*. Neuroreport, 12(13), 2901-2905.
- Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Papathanasiou, G., Bekris, E., Marselos, M. & Ferré, S. (2005). *A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A1 and A2A receptors*. Psychopharmacology, 183(2), 154-162.
- Cipolli, C. Sleep and memory. En Parmeggiani, P. & Velluti, R. (Editores)*The Physiological Nature of Sleep*. Imperial College Press, 2005; Singapoore.
- Costenla, A. R., Cunha, R. A., & Mendonça, A. D. (2010*). Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity.*
- Del Corral, J., Miralles, A., Nicolau, M.C., Planas, B. & Rial, R.V. (1990). *Stereotaxic atlas for the lizard Gallotia galloti*. Progress in Neurobiology, 34: 185-196.
- Dunwiddie TV, Sedative Worth T. and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. J Pharmacol Exp Ther. 1982;220:70–76.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., & Vaugeois, J. M. (2003). *Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A 2A receptor blockade*. Neuropharmacology, 45(7), 977-985.
- Falk, J. L., & Lau, C. E. (1991). *Synergism by caffeine and by cocaine of the motor control deficit produced by midazolam.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 39(2), 525-529.
- Hernan,P & Martha, E. (2006).*Sistema Nervioso*. Programa Editorial Universidad dl Valle. ISB:958-670-488-2.
- Kaplan, G. B., Tai, N. T., Greenblatt, D. J., & Shader, R. I. (1990). *Separate and combined effects of caffeine and alprazolam on motor activity and benzodiazepine receptor binding in vivo.* Psychopharmacology, 101(4), 539-544.
- Kaputlu, I., Şadan, G., & Özdem, S. (1998). *Exogenous adenosine potentiates hypnosis induced by intravenous anaesthetics.* Anaesthesia, 53(5), 496-500.
- Klabunde, R.E (1983). *El dipiridamol la inhibición del metabolismo de la adenosina en la sangre humana. European Journal of* Pharmacology, *93* (1), 21-26 de.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M., & Saper, C. B. (2006). *A putative flip–flop switch for control of REM sleep*. Nature, 441(7093), 589-594.
- Menaker, M., Moreira, L. F., & Tosini, G. (1997). *Evolution of circadian organization in vertebrates*. Brazilian journal of medical and biological research, 30, 305-313.
- Nam, H. W., McIver, S. R., Hinton, D. J., Thakkar, M. M., Sari, Y., Parkinson, F. E., ... & Choi, D. S. (2012). *Adenosine and glutamate signaling in neuron–glial interactions: implications in alcoholism and sleep disorders.* Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 36(7), 1117-1125.
- Pettijohn, T. F. (1979*). Effects of alcohol and caffeine on wheel running activity in the Mongolian gerbil.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 10(3), 339-341.

- Radulovacki M. (1991).*Adenosine and sleep*. In: Phillis JW, editor. Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function. Boca Raton, Fla: CRC Press:381–390.
- Rial, R. V., Akaârir, M., Gamundí, A., Nicolau, C., Garau, C., Aparicio, S., ... & Esteban, S. (2010). *Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: from reptiles to mammals.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 34(8), 1144-1160
- Rial, R.V., Akâaritr, M., Gamundí, A., Nicolau, C., Garau, C., Aparicio, S., Tejada, S., Gené, L., González, J., de Vera , L., Coenen, A.M.L., Barceló, P. & Esteban, S. (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 35 (1): 1-126.
- Rial, R.V., Nicolau, M.C., Gamundí, A., Akaârir, M., Aparicio, S., Garau, C., Tejada, S., Roca, C., Gené, L., Moranta, D. & Esteban, S. (2007). *The trivial function of sleep.* Sleep Medicine Reviews 2007a; 11: 311-325.
- Rial, R.V., Nicolau, M.C., Gamundí, A., Akaârir, M., Aparicio, S., Garau, C., Tejada, S., Roca, C., Gené, L., Moranta, D.& Esteban, S.(2007)*Sleep and wakefulness, trivial and non-trivial: Which is which?* Sleep Medicine Reviews 2007b; 11: 411-417.
- Salín-Pascual, R.J. (2004).Rev Neurol, 39 (4): 354-358.
- Semple-Rowland S.L&Dawson W.W. (1987) *Cyclic light intensity threshold for retinal damage in albino rats raised under 6 Lx*. *Exp Eye Res* 44: 643–661.
- Siegel, J.M., Manger, P.R., Nienhuis, R., Fahringer, H.M. &Pettigrew, J.D. (1998). *Monotremes and the evolution of rapid eye movement sleep.* Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences, 353: 1147–1157
- Siegel, J.M., Manger, P.R., Nienhuis, R., Fahringer, H.M., Shalita, T., Pettigrew, J.D. (1999). *Sleep in the platypus*. Neuroscience, 91 (1): 391-400.
- Siegel, J.M., Manger, P.R., Nienhuis, R., Fahringer, H.M.&Pettigrew, J.D. (1997). *The Platypus has REM sleep*. Sleep Res., 26: 177.
- Underwood, H. (1992). *Endogenous rhythms.* Biology of the Reptilia, 18, 229-297.
- Waldeck, B. (1974). *Ethanol and caffeine: a complex interaction with respect to locomotor activity and central catecholamines*. Psychopharmacologia, 36(3), 209-220.