



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efectos de la cafeína sobre la actividad motora en el reptil *Gallotia galloti*

Adrián Chahboun Guasch

Grau de Biologia

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 47255449V

Treball tutelat per Rubén V. Rial Planas
Departament de Biologia



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

Paraules clau del treball:

Cafeína, Adenosina, Vigília, Sueño, Conmutador.

ÍNDICE

<u>Resumen</u>	<u>4</u>
<u>Abstract</u>	<u>4</u>
<u>Introducción</u>	<u>4</u>
<u>El sueño como un comportamiento</u>	<u>5</u>
<u>Regulación del sueño-vigilia</u>	<u>6</u>
<u>Áreas responsables de la vigilia y el conmutador sueño-vigilia</u>	<u>6</u>
<u>La adenosina y sus receptores</u>	<u>9</u>
<u>La cafeína</u>	<u>9</u>
<u>Introducción a la cafeína</u>	<u>9</u>
<u>Farmacología y absorción</u>	<u>9</u>
<u>Metabolismo</u>	<u>10</u>
<u>Mecanismo de acción</u>	<u>10</u>
<u>Efectos de la cafeína</u>	<u>10</u>
<u>Efectos de la cafeína sobre el estado de vigilia y sueño</u>	<u>10</u>
<u>La evolución del sueño</u>	<u>11</u>
<u>Evolución del sueño: reptiles y mamíferos</u>	<u>12</u>
<u>Hipótesis del trabajo</u>	<u>13</u>
<u>Material y Métodos</u>	<u>14</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>14</u>
<u>Observación y metodología en el análisis de los resultados</u>	<u>15</u>
<u>Resultados y Discusión</u>	<u>15</u>
<u>Conclusiones</u>	<u>18</u>
<u>Agradecimientos</u>	<u>18</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>19</u>

Resumen

En este estudio se desea saber si una serie de tratamientos utilizados ofrecen una respuesta significativa en la actividad motora de los lacértidos de la especie *Gallotia galloti*. En concreto, dichos tratamientos son: intacto, suero salino y cafeína. Se pretende averiguar si el componente adenosina ejerce un efecto similar referente al sueño tanto en mamíferos como en reptiles, es decir, si la adenosina provocaría sueño en los reptiles del mismo modo en que lo haría en mamíferos. Sin embargo, las conclusiones obtenidas serán fruto de la observación del comportamiento de los animales mediante la incorporación por vía intraperitoneal de cafeína, un antagonista de los receptores adenosinérgicos, que en mamíferos actuaría como un estimulante de la actividad motora. Así pues, realizados los análisis estadísticos, se obtuvo que no existían diferencias significativas entre los tres tratamientos previamente mencionados. Esto ofrece como conclusión que la ausencia de efectos de la cafeína sugiere que lo que en un gran número de estudios previos ha sido considerado sueño, en los reptiles no es más que el reposo determinado por la bajada nocturna en la temperatura corporal y los ritmos circadianos de actividad-reposo, pero sin relación con el verdadero sueño de los mamíferos. Además, la inyección de suero salino demostró significativamente que los lagartos no obtenían una variación de la actividad motora con respecto a los otros tratamientos, de modo que el experimentador, si bien podría ser que pudiera ejercer algún tipo de estrés en los animales, éste no se vería reflejado en la actividad motora.

Abstract

This study asked whether a series of treatments used provide a significant response in the motor activity of the species lacertids *Gallotia galloti*. In particular, such treatments are: intact, saline and caffeine. It is intended to determine whether the adenosine component has a similar effect in relation to dream both mammals and reptiles, that is, if the cause adenosine sleep in reptiles just as you would in mammals. However, the conclusions are the result of observation of animal behavior by incorporating intraperitoneally caffeine, an antagonist adenosinergical receptors in mammals which act as a stimulant of motor activity. Therefore, statistical analysis performed, it was found that there were no significant differences among the three treatments previously mentioned. This provides the conclusion that the absence of effects of caffeine suggests that what many previous studies has been considered sleep in reptiles is simply the rest determined by the nocturnal drop in body temperature and circadian rhythms activity-rest, but unrelated to the real dream of mammals. Furthermore, injection of saline showed significantly lizards not obtained a variation in motor activity with respect to other treatments, so that the experimenter, although it could be that could exert any stress on the animals, does not it would be reflected in motor activity.

Introducción

En los estudios del sueño y la vigilia, un problema actualmente no resuelto es la evolución del sueño. En los mamíferos hallamos sueño de tipo electrofisiológico y comportamental, con dos fases: NREM y REM. Las aves presentan las mismas fases que los mamíferos, aunque poseen cantidades bastante reducidas de REM. Así pues, a partir de este hecho, tenemos dos posibilidades. Una posibilidad es que el sueño apareció en algún ancestro común de los dos grupos. De esta forma el sueño, con sus dos fases, sería un rasgo monofilético. En segundo lugar, las dos fases del sueño pueden haber aparecido en los dos grupos de forma independiente. En este caso, las dos fases del sueño serían el resultado de un proceso de convergencia y el sueño sería polifilético.

Intentando resolver este problema, se han realizado estudios sobre los reptiles, el tercer grupo de animales amniotas, junto con los mamíferos y las aves. El resultado ha sido decepcionante, porque no se han encontrado signos inequívocos, ni del NREM, ni del REM. Por esto, podría pensarse que las dos fases serían el resultado de un proceso de convergencia adaptativa y, en conjunto, el sueño sería un proceso polifilético.

Sin embargo, el grupo de Neurofisiología del son i els Ritmes Circadians de la UIB han presentado una hipótesis según la cual el sueño, siendo un proceso subcortical, debe ser el estado de vigilancia más antiguo y la nueva adquisición evolutiva pudo ser la vigilia cortical que apareció como resultado del desarrollo del telencéfalo, que sólo ocurrió en mamíferos y aves.

Todo lo anterior puede ser relacionado con la actividad de los neurotransmisores responsables del control del sueño y la vigilia. Uno de los más importantes es la adenosina que liberada en los núcleos ventrolaterales preópticos (VLPO) del hipotálamo ponen en marcha la entrada en sueño y, recíprocamente, lo impide cuando este neurotransmisor se bloquea. Este último efecto es conocido desde tiempo inmemorial, como consecuencia de la ingesta de metilxantinas de origen vegetal, siendo la cafeína la mejor conocida de todas.

Los efectos de las metilxantinas se han estudiado en numerosas especies de vertebrados y en algunos invertebrados y en todos los casos conocidos aumentan la actividad del sistema nervioso central y también la actividad motora, siendo estos últimos efectos el resultado de su actividad como antagonista de los receptores A1. Sin embargo, y de forma sorprendente, no se han conseguido encontrar estudios de la actividad de la cafeína en vertebrados poiquiloterms.

El sueño como un comportamiento

El sueño es un estado de conciencia que se puede observar tanto en el hombre como en muchos otros animales. Dentro de la variabilidad del reino animal, reconocemos que los organismos poseen sueño por el aspecto característico que poseen al dormir.

Se considera que el sueño presenta una serie de rasgos, como umbrales sensoriales elevados, reposo motor, reversibilidad [Pieron, 1913], recurrencia circadiana [Bruce Durie, 1981]; y regulación homeostática, siendo éste último de especial importancia, debido que nos da un indicio de que el sueño cumple una función relevante y necesaria dentro del organismo de muchos seres vivos, como pueda ser el consumo de alimentos o de agua.

En 1953, dos científicos, Kleitman y Aserinsky descubrieron la existencia del REM. Al descubrirse esta fase del sueño, se afirmó que los sueños únicamente acontecían durante el REM.

Sin embargo, en la actualidad se sabe que los sueños también ocurren, con menor frecuencia, en el NREM y son de calidad diferente a los sueños acontecidos durante el REM. Actualmente, se considera que las estructuras que controlan el inicio del sueño como tal se ubican en la zona ventrolateral preóptica (VLPO) del hipotálamo. Esta área se encuentra conectada con líneas de inhibición de la vigilia, de modo que se crea una especie de mecanismo regulador en *flip-flop*, que posteriormente será explicado con más detalle y que determina la aparición de sueño o vigilia, excluyendo la posibilidad de que se den ambos simultáneamente [Saper *et al.*, 2005].

Concluyendo, no se puede mantener firmemente la relación exclusiva entre los sueños y el REM, debido a que los sueños pueden ocurrir tanto en el REM como en el NREM. Así pues, tenemos dos estados del sueño controlados desde regiones cerebrales muy distintas, por lo que se concluye que los sueños deben poseer una dependencia con estructuras que no son similares a las que controlan las dos fases.

Regulación del sueño-vigilia

La producción de sueño y vigilia está regulada por tres procesos. Uno de estos tres es el ritmo circadiano, que permite la aparición sucesiva de vigilia y sueño dentro de un período de tiempo de unas 24 horas aproximadamente. La oscilación de la temperatura corporal es el mejor indicador del proceso circadiano aunque existen interacciones recíprocas entre el sueño y la temperatura corporal. Así pues, la entrada de sueño produce un cambio en la temperatura corporal del organismo, enfriándolo. La máxima propensión para el sueño se produce en los momentos en los que la temperatura desciende, lo que se consigue por medio de una vasodilatación de los tejidos periféricos que facilita las pérdidas de calor y el descenso en la temperatura del núcleo corporal. Así, la temperatura ejerce importantes efectos sobre la producción del sueño, pero este último también modifica la temperatura.

El segundo proceso que regula la producción del sueño es el homeostático. De acuerdo con este proceso, la propensión al sueño crece de forma exponencial en función de la duración de la vigilia previa y disminuye de forma parecida durante el sueño. Sobre los dos tipos de regulación mencionados, los factores ambientales pueden modificar la estructura del sueño y de la vigilia.

La vigilia y los dos tipos de sueño REM y NREM están controlados por una serie de factores internos y externos que actúan coordinadamente en un circuito neuronal con líneas de inhibición recíproca, lo que hace que el sistema sea monoestable y mantenga, bien la vigilia, bien el sueño. Se conoce un gran número de sustancias endógenas, neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas que intervienen en la producción y la regulación de la vigilia y el sueño, como la melatonina, la histamina, la noradrenalina, etc. El sueño y la vigilia también se modifican por medio de algunos componentes de la ingesta o de la administración de sustancias exógenas, como pueden ser las metilxantinas.

Finalmente, el ultradiano es el tercer proceso que regula la producción del sueño que produce, dentro del sueño, las oscilaciones entre el NREM y el REM. Factores externos como la luz, los ruidos, movimiento o factores generados internamente como el estrés o las preocupaciones que pueda tener un individuo pueden facilitar y promover tanto la vigilia como el sueño.

Áreas responsables de la vigilia y el conmutador sueño-vigilia

Muchísimas áreas que promueven la vigilancia envían conexiones inhibitorias hacia el VLPO. La serotonina y la noradrenalina son dos sustancias que ejercen inhibición de forma directa sobre el VLPO. El núcleo tuberomamilar libera histamina durante la vigilia y es capaz de inhibir, de manera indirecta, la actividad del VLPO.

Existen varias áreas mantenedoras de la vigilia y otras de la entrada en el sueño y que asimismo hay abundantes interconexiones de inhibición recíproca entre ambos grupos, muy especialmente entre las principales áreas generadoras de vigilancia y el VLPO. Esto ha dado lugar a la atractiva hipótesis

de que el conjunto es un sistema biestable, un verdadero conmutador (Figura 1.) que imposibilita la actividad simultánea de los dos grupos y por tanto, tanto la vigilia como el sueño se automantienen y se bloquean una al otro, hasta que llega el momento de una transición.

Existen otras regiones capaces de modular las transiciones entre sueño y vigilia en este conmutador. Así pues, entre las más importantes destacan las influencias circadianas que están coordinadas desde el núcleo supraquiasmático, que posee conexiones neuronales que conectan directamente con el VLPO y la glándula pineal secretora de melatonina, que probablemente actúa directamente sobre las neuronas hipotalámicas y talámicas responsables de la producción de sueño activando la liberación del GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio del estado de vigilia.

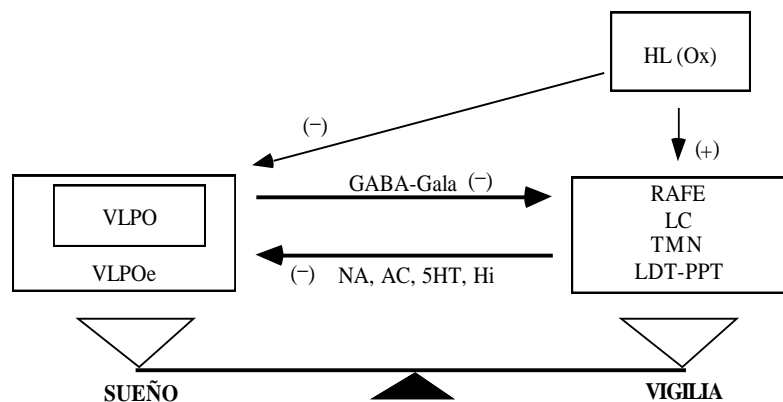


Figura 1.- El conmutador sueño-vigilia. Los núcleos Ventró-Lateral-Preóptico central (VLPO) y extendido (VLPOe) son responsables del inicio del sueño y mantienen conexiones de inhibición recíproca con los centros responsables del inicio de la vigilia: el rafe dorsal, el locus ceruleus, el núcleo tubérculo-mamilar y el conjunto Latero-Dorsal del Tegmento-Núcleo Pedúnculo-Pontino (LDT-PPT). Estas líneas de inhibición recíproca, funcionando con GABA-Galanina, por una parte y noradrenalina, acetilcolina, serotonina e histamina en la otra, determinan que las transiciones entre vigilia y sueño ocurran sin estados intermedios y cada uno de los estados se automantenga. El hipotálamo lateral (HL), liberando orexinas, ayuda a mantener la estabilidad de los dos estados. Por otra parte, los cambios de estados son debidos a otras influencias ejercidas sobre el sistema (no mostradas en el esquema), como por ejemplo, las influencias circadianas o los estímulos ambientales.

Las orexinas liberadas por el hipotálamo lateral ejercen un efecto notable sobre el conmutador sueño-vigilia. Estos péptidos inhiben la actividad del VLPO y probablemente activan los estados en los que existe actividad motora, como la vigilia, por lo que resulta interesante y a tener en cuenta para la realización del experimento, debido a que es una sustancia posiblemente promotora de la actividad motora en los lacértidos.

A continuación se muestra de manera más detallada la neuroanatomía del cerebro implicada en los estados de sueño-vigilia, que ofrece al lector una mejor comprensión de las estructuras cerebrales implicadas en estos dos procesos, así como también los neurotransmisores liberados por dichas estructuras:

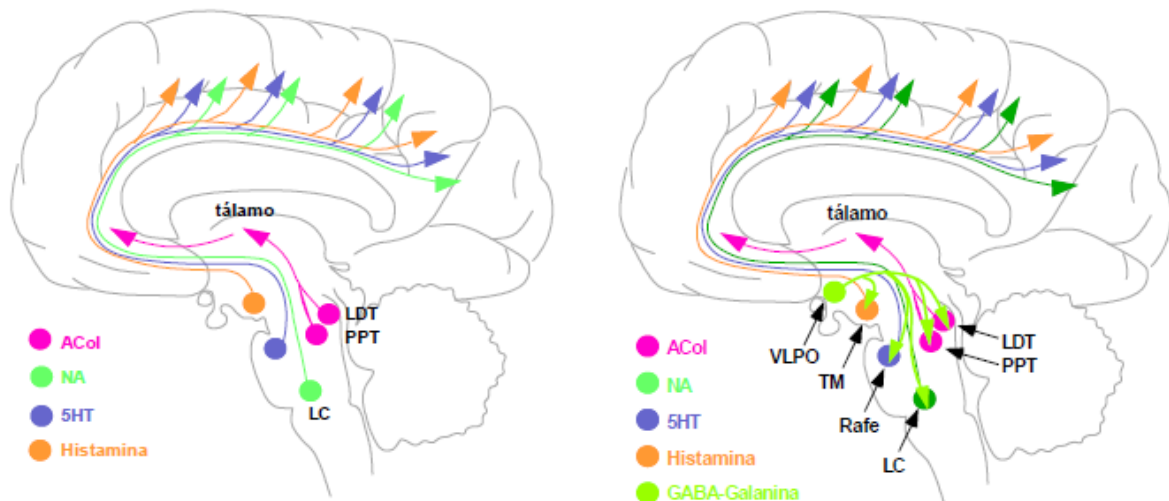


Figura 2. Representación gráfica del sustrato neuroanatómico controlador de la vigilia (izq.) y del sueño (dcha.): núcleos pedúnculo-pontino y latero-dorsal del tegmento (LDT-PPT), Locus coeruleus (LC), núcleo tuberomamilar (TM), núcleo ventrolateral preóptico (VLPO).

En la vigilia, como se observa en la Figura 2., su principal sustrato es la formación reticular del tronco encefálico que constituye el llamado sistema reticular ascendente de activación. La vigilia se asocia a una liberación muy alta de acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), histamina (HI) y serotonina (5-HT) en todas las áreas de la corteza cerebral, lo que concuerda con una elevada actividad neuronal de las regiones colinérgicas del tronco encefálico (núcleos pedunculopontino y laterodorsal del tegmento pontino, PPT y LDT), noradrenérgicas (locus coeruleus, LC), serotonérgicas (núcleos anteriores del rafe) e histaminérgicas del hipotálamo lateral [Jones & Cuello, 1989].

Para finalizar, cabe mencionar la importancia de los factores ambientales en la modulación de la producción tanto de sueño como de vigilia, modificando la posición del conmutador en una u otra dirección.

Como hemos observado, existen un gran número de sustancias presentes en el cerebro de los mamíferos que, liberadas por una serie de núcleos y dirigidas a ciertas áreas del cerebro promueven la aparición o la inhibición de los estados de vigilia y sueño.

A continuación, y a partir de los conocimientos comentados con anterioridad sobre las áreas y los mecanismos que hacen posible la aparición o desaparición de los estados de sueño-vigilia, nos centraremos en dos sustancias cuyos efectos resultan antagónicos para una serie de receptores que promueven el sueño cuando son estimulados por sustancias agonistas.

Dichas sustancias no se han mencionado con anterioridad y constituirán los componentes que formarán parte de los tratamientos aplicados a los reptiles de la especie *Gallotia galloti*, cuya metodología y materiales necesarios para su inserción en el cuerpo de estos organismos serán explicados más adelante, en su correspondiente apartado.

Con este experimento se pretenderá comprobar si los mecanismos que promueven el sueño y la vigilia son similares en vertebrados homeotermos como las aves y los mamíferos (cuyos experimentos ya han sido realizados en estudios anteriores) o si, por otro lado, los reptiles poseen comportamientos diferentes para el agonista (adenosina) y para el antagonista (cafeína), como bien se menciona en la hipótesis del trabajo.

Por otro lado, cabe mencionar que en este experimento no utilizaremos la sustancia adenosina, aunque resulta relevante explicar su naturaleza y su importancia como sustrato promotor del sueño en mamíferos. A continuación, se citarán las características más relevantes presentes en cada una de estas dos sustancias, así como también su papel en el sistema nervioso y su relación con la actividad motora.

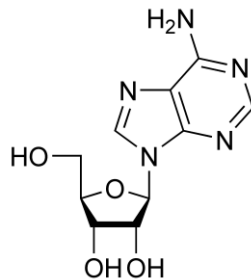
La adenosina y sus receptores

La adenosina es un neurotransmisor inhibitorio en el SNC, suprime la excitación promoviendo así el sueño. Es un derivado del ATP que, liberado en el VLPO central ejerce una función promotora del sueño cuando entra en contacto con una serie de receptores de adenosina. Los receptores adenosinérgicos son los siguientes que se exponen a continuación: A₁, A_{2A}, A_{2B}, y A₃

Para los receptores A₁, A_{2A} y A_{2B}, la adenosina es el agonista endógeno más importante [Lovallo, 2005].

Los receptores de adenosina A₁, A_{2A} son expresados en los ganglios basales, que son una serie de estructuras que juegan un papel en el control motor [Fisone, 2004]. El receptor A₁ de la adenosina se encuentra presente por todo el cerebro y la médula espinal [Fredholm, 1999].

A continuación, se muestra la estructura química de la adenosina:



La cafeína

Introducción a la cafeína

La cafeína es una sustancia ampliamente consumida en todo el mundo durante siglos. Se dice que el café fue descubierto por los pastores yemenitas en el siglo V, al observar que las cabras que comían frutos del cafeto eran más ágiles e inquietas.

Los primeros cultivos aparecieron en Etiopía. La técnica de tostar y moler los granos del café fue desarrollada en el siglo XV, y el consumo de productos con cafeína se expandió rápidamente por todo el globo. La infusión es la forma más común de consumo de cafeína aunque, sin embargo, en el mercado hay numerosas bebidas refrescantes con diferentes concentraciones de cafeína.

Entre los efectos favorables de su consumo moderado, destacan aquellos sobre el sistema nervioso central, tales como el aumento del estado de alerta y la mejoría de las funciones cognitivas. La disminución de la fatiga, es quizá su efecto más distintivo [Glade, 2010]. Su consumo se ha asociado a efectos sobre el estado de ánimo, como la percepción del aumento de la energía, eficiencia, vigilia y motivación.

Farmacología y absorción

La cafeína es un derivado trimetilado de la xantina. Existe en estado natural en plantas originarias de distintas regiones del mundo. La cafeína es, en concreto, la 1,3,7-trimetilxantina. La xantina

deriva, a su vez, de la purina, unión de los heterociclos pirimidina e imidazol [Fredholm, 1999; Pardo-Lozano, 2007].

La cafeína, administrada oralmente, se absorbe rápida y completamente, alcanzando una concentración máxima en plasma a los 30 minutos [Fredholm, 1999]. Es una sustancia farmacológicamente activa cuya vida media en el ser humano se estima entre las 4 y 5 horas [Finnegan, 2003].

Metabolismo

La cafeína es metabolizada en el hígado, por la isoenzima del citocromo P-450 (CYP), subfamilia 1A, gen 2 (CYP1A2) [Fredholm, 1999].

Mecanismo de acción

La cafeína se une a los receptores A1 y A2a de la adenosina, actuando como antagonista competitivo. Inhibe la fosfodiesterasa que da lugar a un aumento de las concentraciones de AMPc y de GMPc, una activación de canales de K⁺ y una inhibición de los canales de calcio de tipo N. En cerebro, los receptores de adenosina inhiben la liberación de numerosos neurotransmisores (GABA, acetilcolina, dopamina, glutamato, noradrenalina y serotonina), la cafeína producirá el efecto contrario. La cafeína actúa a concentraciones mucho mayores de las cuales antagoniza la adenosina, como inhibidor directo de la fosfodiesterasa, Como consecuencia, es un poderoso estimulante del sistema nervioso central, de los músculos de la respiración y del músculo esquelético en general [Finnegan, 2003; Specterman, 2005; Lovallo, 2005].

Efectos de la cafeína

La activación generalizada del SNC por la cafeína es dependiente de la dosis, al aumentar la liberación de noradrenalina, aumenta la alerta, reduce la sensación de cansancio y fatiga, aumenta la capacidad de mantener un esfuerzo intelectual y mantiene el estado de vigilia, aun con privación de sueño. Mediante la inhibición de los receptores A2, la cafeína refuerza la liberación de dopamina en el circuito cerebral de recompensa (sistema mesolímbico y nucleus accumbens). Esta acción se explicaría por un aumento de la fosforilación del DARPP-32 (fosfoproteína de la regulación de dopamina y AMPc).

Además, la cafeína mejora el rendimiento físico por vasodilatación a nivel muscular, aumentando la respuesta contráctil al estímulo nervioso y disminuyendo el cansancio y la fatiga [Castellanos, 2006; Fredholm, 1999; Pardo-Lozano, 2007].

Sin embargo, no todo el mundo posee una respuesta similar a los efectos de la cafeína: algunas personas pueden beber varias tazas de café, té o bebidas con cafeína dentro de una hora sin sentir efectos estimulantes. Otros pueden sufrir efectos estimulantes después de sólo una copa. Esto significa que las diferencias individuales son un factor importante que se ha de tener en cuenta, con respecto a la sensibilidad de la cafeína a la tolerancia y la dependencia [Castellanos, 2006; Fredholm, 1999].

Efectos de la cafeína sobre la vigilia y el sueño

La cafeína es la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo [Drapeau, 2006]. La evidencia científica ha descrito ampliamente los efectos benéficos del consumo de cafeína, en varios sistemas fisiológicos, incluido el sistema nervioso central. El efecto más claro de la cafeína es la estimulación del estado de alerta, con lo que se produce mejor expresión de las funciones cognitivas y de la actividad psicomotriz.

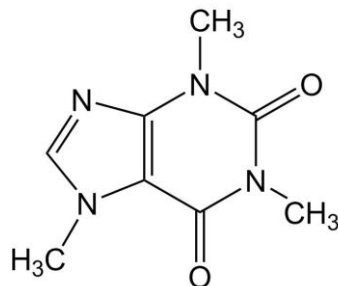
Respecto de los mecanismos de acción, se ha demostrado que los efectos estimulantes de la cafeína se deben a su capacidad de antagonizar los receptores de la adenosina, que es un neuromodulador inhibitorio involucrado en la propensión al sueño [Elmenhorst, 2011; Huang, 2005].

Por otro lado, se sabe que el sueño adecuado, es esencial para la expresión cognitiva óptima. Sin un sueño suficiente, los procesos mentales se vuelven lentos, inestables y existe la tendencia a cometer errores [Drapeau, 2006]. La pérdida de sueño por privación del mismo, o bien por la presencia de algún trastorno de sueño, hace difícil mantener el estado de alerta, con lo cual el tiempo de reacción y la vigilancia psicomotora, se ven afectados. La privación de sueño además, afecta los procesos emocionales, con influencia indirecta en muchos otros aspectos cognoscitivos, como el juicio y la toma de decisiones.

Existen estudios epidemiológicos en los cuales se ha demostrado, que la privación de sueño es muy frecuente en los habitantes de las grandes ciudades, lo cual provoca fatiga crónica y somnolencia diurna, situaciones que a su vez aumentan el riesgo de accidentes de tránsito, laborales y domésticos [Sagaspe, 2005]. Ante esto, varias sustancias estimulantes se utilizan frecuentemente para mejorar el rendimiento, durante periodos de somnolencia o de vigilia prolongada. La cafeína es la sustancia más comúnmente utilizada, y ha mostrado tener efectos favorables en el mantenimiento del estado de alerta.

La evidencia científica indica que el consumo moderado de cafeína incrementa el estado de alerta, vigilia y la sensación de energía. También mejora la ejecución cognitiva, aumenta la capacidad de concentración y enfocar la atención, agilizando el tiempo de reacción e incrementando la eficacia de reacción, así como la habilidad para resolver problemas que requieren razonamiento. La cafeína mejora la capacidad de ejecución reducida ocasionada por la privación de sueño, disminuye la fatiga física y mental, así como la sensación de esfuerzo asociada con actividad física [Glade, 2010].

A continuación, se muestra la estructura química de la cafeína:



La evolución del sueño

En animales más simples, como los reptiles, únicamente se distinguen ciclos de actividad y reposo, que son además universales para todos los organismos, incluyendo bacterias y plantas, ya que permiten obtener una mejor eficiencia en el uso de los recursos. De esta manera, no es preciso explicar por qué dormimos, sino por qué existen diferencias tan significativas en la complejidad de los estados de inactividad en mamíferos y aves. Atendiendo a ello, se propone que la complejidad del sueño en los mamíferos no sea más que el resultado evolutivo del aumento de la complejidad cerebral y en particular, de la corteza. La aparición de la corteza supuso, junto con la termorregulación, la independencia del organismo frente al ambiente y con ello, la necesidad de una reorganización cerebral para un nuevo tipo de vigilia controlada desde la corteza. Así pudo haberse conseguido la repartición del tiempo en dos fases, una de actividad y otra de reposo.

Este enfoque supone que en la especie humana el sueño REM no es necesario, confirmando observaciones de M. Jouvet [Jouvet, 1999], y que el sueño de los mamíferos realmente es un residuo evolutivo de la vigilia de los reptiles [Rial *et al.*, 2007a; Rial *et al.*, 2010].

Esta hipótesis afirma que la vigilia cortical de los mamíferos es un nuevo estado evolutivo, dado que en reptiles, así como en todo animal pre-mamífero, el sustrato de ésta, la corteza, no existe.

Un mamífero primitivo probablemente se vio enfrentado a la posibilidad de disponer de dos tipos de vigilia: la reptiliana primitiva, controlada por estructuras subcorticales, y la mamífera moderna, controlada por la masa telencefálica. Asumiendo que la vigilia cortical permitió un comportamiento mejor adaptado a las condiciones ambientales impuestas a estos primeros mamíferos, la vigilia subcortical reptiliana debió suprimirse, integrándose en el reposo circadiano con la forma del sueño tal como se observa en los mamíferos actuales.

Cabe destacar que en la vigilia de los reptiles actuales se observan dos fases fácilmente diferenciables: una en la que el animal se esfuerza en mantener una temperatura corporal adecuada mediante heliotermia-tigmotermia, y otra en la que el animal activamente explora el medio, se alimenta, busca pareja, etc. En el primer caso dominan claramente las funciones de control homeostático, de dominio parasimpático, mientras en el segundo caso, con dominio simpático, se permite su abandono durante un tiempo limitado. Estas características se complementan con la hipótesis según la cual el sueño de los mamíferos es homólogo a la vigilia de los reptiles, de manera que las dos fases descritas de vigilia en reptiles se convirtieron en el sueño NREM y REM de los mamíferos: el NREM con dominio de control homeostático y parasimpático y el REM con el abandono parcial de la homeostasis y dominio simpático.

A partir de lo mencionado anteriormente, se entiende que la privación de REM tenga mínimas consecuencias sobre el mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas de los mamíferos. Atendiendo a que el sueño sea un residuo evolutivo de lo que antes sí fue un estado esencial en la vida reptiliana, su supresión no tiene necesariamente porqué suponer un problema evidente, tal como se ha observado a partir de la supresión selectiva del REM durante tratamientos farmacológicos o lesiones traumáticas.

Evolución del sueño: reptiles y mamíferos

Hacia la mitad del siglo XX se iniciaron los estudios sobre la evolución del sueño atendiendo al escalón filogenético de reptiles a mamíferos. Dado que se había descubierto la existencia de dos fases en el sueño de los mamíferos, se ansiaba encontrar indicios de sus rudimentos en otros grupos animales. Dadas sus características, su aspecto “primitivo”, el control rombencefálico, la poiquilotermia y su preponderancia en animales inmaduros, se consideró que el REM era el sueño primitivo y se esperaba encontrarlo en el sueño de los reptiles. Sin embargo, las expectativas no se cumplieron.

Al estudiar el sueño del equidna, un animal con muchos rasgos reptilianos, se observó que este parecía no tener sueño REM. Estos resultados plantearon que el sueño primitivo fuese el NREM y no el REM. A estas evidencias se sumaron otras obtenidas en tortugas, pero los resultados nunca fueron claros. En primer lugar, las conclusiones se habían obtenido a partir de un número muy limitado de animales, sin validez estadística. En segundo lugar, los resultados ni siquiera fueron consistentes, con notables diferencias entre los pocos individuos estudiados.

La suposición de que el NREM fuese el sueño primitivo recibió el golpe final tras el análisis del sueño del ornitorrinco, en el cual se observó una enorme proporción de REM (hasta un 60% del sueño total), mucho mayor que la de cualquier otro animal conocido [Siegel *et al.*, 1999]. Por el contrario, este resultado supuso un fuerte apoyo a otra hipótesis ya descrita, según la cual el sueño de los mamíferos es un residuo de la primitiva vigilia de los reptiles. En publicaciones sucesivas, la hipótesis

se extendió y en la actualidad ofrece un panorama completo de la evolución del sueño, la vigilia y la hibernación.

Los primeros estudios del EEG en los reptiles ignoraron la importancia de la temperatura corporal, que en estos animales sufre importantes variaciones entre el día y la noche, o lo que es lo mismo, entre su vigilia y su reposo. Aunque los reptiles carecen de mecanismos fisiológicos para mantener su temperatura corporal constante, los consiguen de forma muy eficaz mediante adaptaciones de su comportamiento (heliotermia y tigmotermia). Durante su fase de reposo son termoconformistas, con una temperatura próxima a la del medio ambiente. Esta baja temperatura, como consecuencia del Q10 explica que durante la noche, cuando se suponía que los reptiles dormían, su EEG nunca alcanzaba una amplitud similar a la registrada en el NREM de mamíferos.

Por el contrario, un reptil activo, con una temperatura corporal elevada exhibe un EEG polimorfo en el que dominan las ondas lentas de alto voltaje, similares a las de un mamífero durante el NREM; además, aparecen husos en la banda de frecuencia sigma, los cuales se parecen a los husos del sueño de los mamíferos; y finalmente, muestran potenciales evocados de gran amplitud semejantes a los complejos K que aparecen en los mamíferos durante el NREM. Cabe destacar además, que los signos de activación del EEG son opuestos en mamíferos y reptiles.

Conjuntamente, los signos descritos sugieren la existencia de una homología filogenética entre la vigilia de los reptiles y el sueño de los mamíferos, a pesar de que las funciones en ambos casos sean completamente distintas. De forma específica, el supuesto sueño nocturno de los reptiles es un estado pasivo que probablemente equivale a la hibernación de algunos mamíferos. A su vez, la vigilia diurna de los reptiles, al ser desplazada por la vigilia cortical, tuvo que suprimir la mayor parte de sus respuestas motoras, quedando convertida en sueño.

Por último, se han distinguido dos fases básicas en los reptiles activos: durante una parte del tiempo ajustan su temperatura corporal, por medio de la heliostermia y la tigmotermia ya descritas, así como también mantienen un buen control de todas las constantes fisiológicas. Una vez que han conseguido llegar a la temperatura corporal deseada, entran en una segunda fase, en la cual buscan alimentos, ocurren encuentros sexuales, resuelven conflictos territoriales y evitan o escapan de los depredadores. Evidentemente, en muchas ocasiones las exigencias de esta fase son incompatibles con la homeostasis, ya sea porque los comportamientos respectivos no se efectúan en los lugares más convenientes para mantener la temperatura corporal preferida o, también porque sufren taquicardias, cambios en la composición gaseosa de su medio interno, etc.

De acuerdo con estos datos, la hipótesis propuesta en los trabajos de Rial [Rial *et al.*, 1994, 2001, 2010] supone que la fase en la que domina la homeostasis de un reptil se convirtió en el sueño NREM y la fase en la cual los reptiles buscan alimento, contactos sociales y evitan la depredación, se convirtió en sueño REM, para lo cual sólo fue necesario la inhibición de todas las salidas motoras. Esta hipótesis destaca por su parsimonia en relación a las anteriormente formuladas, ya que requiere un único cambio evolutivo, el desarrollo de la corteza telencefálica, ajustándose muy bien, además, a los cambios termorreguladores que se dan durante el sueño de los mamíferos [Rial *et al.*, 2007b, 2010].

Hipótesis del trabajo

Aunque la relación de la adenosina y la cafeína con la vigilia y el sueño puede ser más compleja de lo esperable, sería de gran interés estudiar los efectos de la cafeína, la adenosina y sus agonistas en los poiquiloterms y, de acuerdo con la hipótesis de que el sueño de los mamíferos es equivalente a la vigilia de los reptiles, cabe la posibilidad de que la adenosina hipotalámica determine vigilia en estos animales, un resultado diametralmente opuesto al conocido en los mamíferos. Existen pues dos posibilidades: en primer lugar la cafeína podría tener en los reptiles los mismos efectos que en los mamíferos, lo que sería contradictorio con la hipótesis descrita. Pero también sería posible que la

cafeína, o bien no tuviera ninguna actividad, o que incluso ejerciera efectos hipnóticos en los poiquiloterms y, recíprocamente, los agonistas de la adenosina, estuvieran asociados a la vigilia.

Material y Métodos

Para el presente estudio se han utilizado 12 animales de la especie *Gallotia galloti*, de sexo indeterminado. Los lacértidos, endémicos de la isla de Tenerife, se capturaron en la zona de Güimar (noroeste), bajo la autorización pertinente del Gobierno Autónomo Canario. Para ello se utilizaron recipientes de hojalata a modo de trampas, con trozos de tomate como cebo.

Los animales se mantuvieron en terrarios en los que se mantuvo un ciclo de 12/12 horas de luz-oscuridad y a la vez proporcionaba calor.

El área de experimentación donde tuvo lugar el estudio sobre la actividad motora de los lacértidos bajo diferentes tratamientos fue en un laboratorio de fisiología animal de la UIB. En concreto, los animales fueron introducidos en un recipiente rectangular de cristal cuyas dimensiones fueron de 30x40cm. Los 12 individuos escogidos para realizar el experimento se agruparon en grupos de 3, de manera que se obtuvo un total de 4 grupos constituidos por 3 miembros en cada uno de éstos.

Además, para evitar que los individuos tuvieran reacciones en la actividad motora por factores externos, como objetos externos al recipiente que pudiesen estar en movimiento u otros posibles factores visuales que hubiesen podido intervenir en el experimento y perturbar los resultados de las variables objeto de estudio, el recipiente se envolvió con papel opaco, eliminando así del alcance de los individuos cualquier factor externo que pudiese motivarles a incrementar la actividad motora.

La ubicación donde se llevó a cabo el experimento proporcionaba, además, un lugar aislado en el que se pretendía evitar que la acción de agentes externos sonoros pudiesen repercutir y alterar los resultados sobre la actividad motora de los lagartos. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiental y con una lámpara que hacía la función de iluminar a los individuos para permitir así su correcta observación en el momento de realizar el análisis de los registros.

Además de la iluminación débil pero idónea para la identificación de los individuos que se utilizó, en el recipiente rectangular había como sustrato, piedras de color blanquecino, que contrastaban fuertemente con el color oscuro de estos animales. Ello facilitaría aún más al observador la identificación de cada uno de los ejemplares presentes.

Finalmente, la distinción de cada uno de los miembros de cada grupo se llevó a cabo mediante el uso de marcas blancas de diferente tipo encima de sus cuerpos, lo que permitió discriminar cada individuo de sus congéneres.

Tratamientos

Cada uno de los lagartos fue sometido, en su correspondiente grupo, a 3 tratamientos: intacto, suero salino y solución con cafeína. En el tratamiento intacto, no se les aplicó ninguna medida los individuos. Se cogieron cada uno de los grupos por separado y se introdujeron los 3 miembros de cada grupo directamente a registrar la actividad motora durante un periodo de 4 horas.

Durante la preparación del suero salino, cogimos 4.5g de cloruro sódico y los introducimos en 500 ml de agua destilada. El resultado sería utilizado para el control salino. Seguidamente, a cada individuo presente en un grupo (y para el experimento con tratamiento de suero salino) se introdujo una cantidad de 0.5ml de suero fisiológico vía intraperitoneal.

Finalmente, tenemos el tratamiento con cafeína diluida. Para realizar la dosis de cafeína, primero de todo pesamos cada uno de los individuos y obtuvimos un peso medio aproximado de 30g/lagarto.

En mamíferos y, en concreto, en los seres humanos, se conoce que una taza de café tiene unos 100mg de cafeína. Si esta cantidad se administra a un humano de 70 k, resulta que la dosis recibida es de 100/70 mg/k, lo que es lo mismo que 1.4mg/k, o lo que es lo mismo que 1.4 µg/g. Dado que en promedio un lagarto pesa 30 g, una dosis equivalente a un café correspondería a 1.4µg x 30g que equivale a 42 µg por animal. Naturalmente, la dosis indicada es la que corresponde a un consumidor habitual, que probablemente ha desarrollado tolerancia. Por esto, se estimó que la cifra más conveniente para un animal sin experiencia previa y por vía intraperitoneal debía ser algo menor y se redujo a 30µg por animal. Así pues, se elaboró una disolución de suero salino con 15 mg de cafeína en 250 ml de suero salino, que equivale a 60 mg/l, o 60µg/ml. A partir de esta disolución, a cada animal fue inyectado con 0.5ml de solución vía intraperitoneal.

En síntesis, tenemos que 12 lagartos fueron sometidos a 3 tipos de tratamientos: intacto, que no recibió ninguna inyección, suero salino y suero salino con cafeína. Por otra parte, dado que los mismos animales sufrieron los tres tratamientos, el orden de los tres experimentos se balanceó, con un primer grupo de animales cuyo comportamiento se estudió en el orden intacto, salino, cafeína, un segundo grupo con el orden salino, cafeína, intacto y un tercero con el orden cafeína, intacto, salino.

Observación y metodología en el análisis de los resultados

Una vez introducidos los 3 miembros de un mismo grupo en el terrario que se usó para el estudio, los animales fueron observados por una cámara web que permaneció conectada a un ordenador portátil durante un período total de 4 horas, que es el periodo de muestreo utilizado para cada tratamiento, considerándose este intervalo de tiempo como una medida de tiempo ajustada a los periodos en los cuales las sustancias utilizadas podían alcanzar los efectos máximos y, por ende, la introducción de tiempo adicional a esas 4 horas no aportaría resultados significativos para el estudio.

Una vez obtuvimos los vídeos correspondientes a los 3 tratamientos hechos sobre los 12 individuos muestreados, se procedió a la recopilación de datos y a la obtención de resultados a partir de los registros audiovisuales obtenidos y almacenados en el ordenador portátil.

Para poder extraer resultados a partir de los registros obtenidos, se utilizó un software informático que recibe el nombre de Image J. A continuación, se procedió a observar los vídeos para medir la cantidad de movimiento realizado por el animal sometido a un determinado tratamiento.

El programa ImageJ mide el número de píxeles presentes en una imagen y los transforma en centímetros después de aplicar un factor de escala previamente determinado. Para determinar la posición del animal se tomó como referencia el hocico y los resultados de las medidas se anotaron en una hoja de cálculo para su estudio posterior.

Para realizar el análisis estadístico de los datos, se utilizó el programa informático Rstudio, mediante el cual se pudo hacer estadística descriptiva, ANOVA y establecer así si existen o no diferencias en los diferentes tratamientos utilizados durante la investigación.

Resultados y discusión

En el gráfico 1 que se puede observar a continuación, vemos representado en el eje de abscisas los 24 intervalos de 10 minutos, mientras que en el eje de ordenadas representa la distancia promedio en centímetros. En la leyenda ubicada a la derecha del gráfico, se observan coloreados los 3 tratamientos realizados en el experimento. Cada punto hallado en el gráfico representa el promedio de las distancias recorridas por los doce individuos para cada intervalo temporal.

Así, este gráfico nos muestra la evolución del comportamiento de los lacértidos a lo largo del experimento para los diferentes tratamientos usados. Puede comprobarse, en primer lugar, que no

hubo diferencia apreciable entre los tres grupos, lo que significa que la cafeína no produjo ningún efecto significativo. En segundo lugar es evidente que la actividad inicial fue mucho mayor que la final. Es probable que la elevada actividad inicial fuera motivada por la manipulación de los animales y su introducción en un recinto nuevo, pero es evidente que a partir de la tercera hora, los niveles de actividad eran mínimos y prácticamente estacionarios.

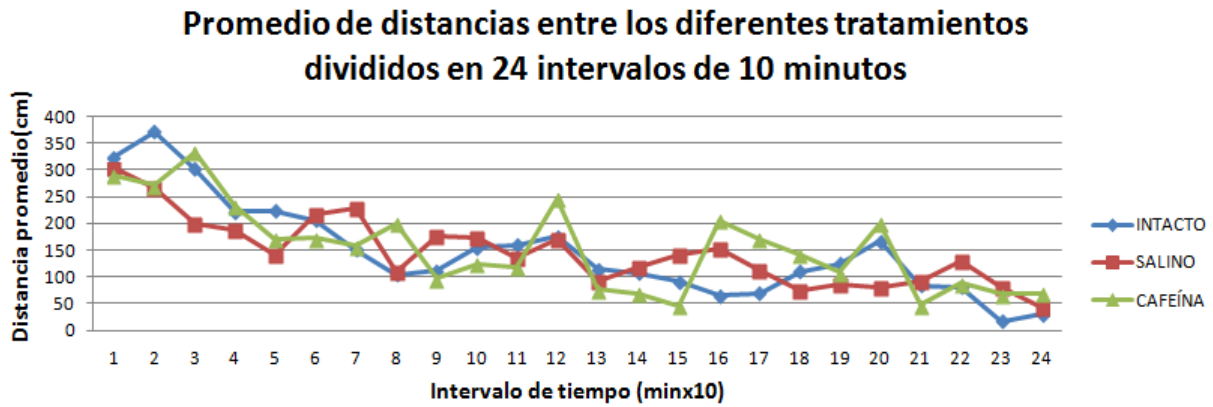


Gráfico 1. Promedio de distancias entre los diferentes tratamientos divididos en 24 intervalos de 10 minutos.

También realizamos un histograma (Figura 1.) en el que se puede observar, como curiosidad, las distancias totales en centímetros acumuladas por todos los individuos de los tres tratamientos durante 4 horas:

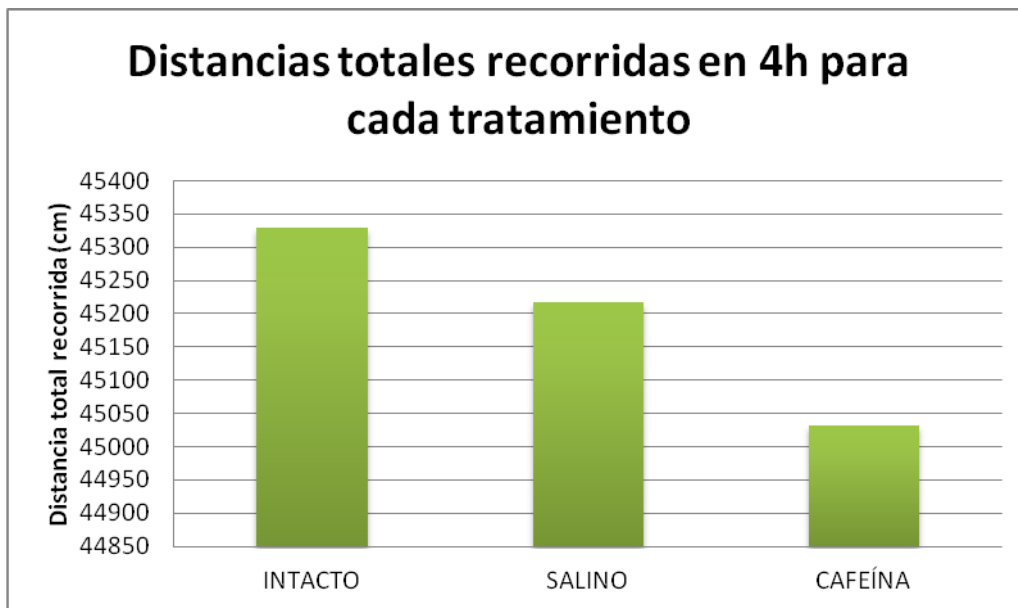


Figura 1. Distancias totales recorridas por los 12 individuos durante 4h para cada tratamiento.

Sin embargo, tanto el gráfico 1. como la figura 1. no revelan la existencia de diferencias significativas entre las distancias recorridas por los individuos en los diferentes tratamientos, de modo que para poder saber si existe algún tratamiento en el que se puedan hallar diferencias significativas en las distancias recorridas por los individuos, se hizo un ANOVA por bloques, debido a que las muestras estaban emparejadas y todos los individuos utilizados durante la experimentación estuvieron expuestos a los tratamientos intacto, suero y salino.

Se utilizó el programa estadístico Rstudio. Los resultados, se han representado como un diagrama de cajas (Figura 2.), en el que se puede observar representado en el eje de abscisas los tratamientos y en el eje de ordenadas, la distancia en centímetros. En dicha figura, se observan valores atípicos así como también las desviaciones típicas para los diferentes tratamientos. Como resultado, las diferencias entre las medias de los diferentes tratamientos durante el periodo de 4 horas no fueron significativas, lo que se hace evidente por la coincidencia en las desviaciones típicas.

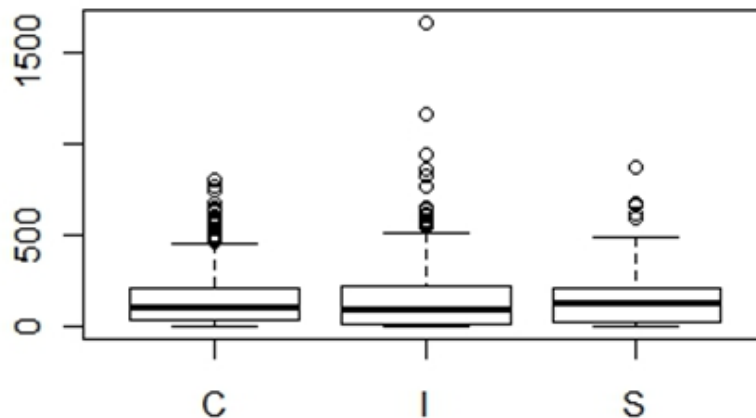


Figura 2. En el eje de abscisas se representan los tratamientos: C (cafeína), I (intacto) y S (salino). El eje de ordenadas representa la distancia recorrida en cm. Los círculos representan los *outliers* o valores atípicos, que son observaciones numéricas que se encuentran distantes respecto al resto de datos.

En efecto, estableciendo inicialmente un intervalo de confianza del 95%, se obtuvo un p-valor de 0.7. Dicho p-valor rechazaría la hipótesis alternativa y aceptaría la hipótesis nula, es decir, que no hay razones para rechazar la igualdad en los promedios de las distancias recorridas en los diferentes intervalos de 10 minutos.

En términos metodológicos, la vía intraperitoneal utilizada garantiza que la dosis de la sustancia inyectada es absorbida en su totalidad. Si hubiésemos elegido la vía oral, no aseguramos que la cantidad de sustancia sea absorbida en su totalidad. Además los efectos por vía oral hubiesen aparecido mucho más tarde. Así que para economizar en tiempo y optimizar en la calidad de los resultados, se decidió usar la vía intraperitoneal.

Por otro lado, la incorporación de dos controles, intactos y salinos garantiza que la manipulación de los animales no produjo efectos propios que pudieran explicar las diferencias (o incluso la ausencia de diferencias) entre los animales con o sin cafeína. A esto, se añade que al balancear el orden de los experimentos también se garantizó que ninguna de las manipulaciones experimentales produjera efectos residuales que pudieran manifestarse en experimentos sucesivos en los mismos animales.

Con todo lo anterior, el resultado principal del presente trabajo ha sido la ausencia de efectos estimulantes en la cafeína administrada. Cabría suponer que dado el bajo metabolismo de los poiquilotermos, el tiempo de estudio podría haber sido insuficiente como para que los efectos estimulantes de la cafeína se hubieran llegado a manifestar. Sin embargo, la reducción continua observada al analizar la movilidad en períodos de 10 min hace muy improbable que ni siquiera después de cuatro horas no se haya registrado ningún efecto activador. Por esta razón se considera muy probable que, al menos a la dosis usada, la ausencia de efectos estimulantes de la cafeína sea real.

Cabe señalar que no se ha encontrado ninguna referencia previa en la que estudien los efectos de estas sustancias en animales poiquilotermos. Por consiguiente, no hay ninguna posibilidad de comparar los resultados obtenidos con otros anteriores y, de esta forma, si la cafeína, bien reconocida como antagonista de la adenosina, no causa efectos sobre la actividad motora, debe concluirse que la adenosina no debe intervenir en la regulación de los estados en los reptiles. Estudios previos del laboratorio de Fisiología del son i els ritmes circadiaris de la UIB mostraron que, a diferencia de los mamíferos, los reptiles no muestran la reacción característica de alerta del EEG en los mamíferos, con reducción de la potencia y aumento de las ondas de alta frecuencia. Al contrario, la activación del EEG nunca toma el aspecto todo o nada y, por el contrario siempre es gradual, lo cual es un signo muy claro de que en los reptiles no existe el mecanismo biestable (el flip-flop) que regula el sueño de los mamíferos (De Vera *et. al*, 1994; Rial *et. al*, 2007a; 2007b; 2010).

Como debilidad del trabajo, debe mencionarse que se ha ensayado una única dosis de cafeína, por lo cual sería conveniente estudiar los efectos de dosis mayores. Si la ausencia de efectos observada en el presente trabajo se confirmara, se debería concluir que el supuesto sueño de los reptiles no es sueño, sino que solamente sería reposo forzado por la oscuridad y el enfriamiento corporal y no tendría nada que ver con el sueño de los mamíferos.

Conclusiones

1. Se ha estudiado la actividad motora del reptil *Gallotia galloti* en cautividad por medio de cinematografía. Según todos los indicios, el método tiene sensibilidad suficiente para detectar los efectos de los estimulantes del sistema nervioso central.

2. Se ha observado que la inyección intraperitoneal de 0.5 ml de suero salino no ha modificado la actividad motora de los animales.

3. Se ha observado una ausencia total de efectos estimulantes de la cafeína a dosis de 1.4 mg/kg sobre la actividad motora del animal estudiado.

4. La ausencia de efectos de la cafeína sugiere que lo que en un gran número de estudios previos ha sido considerado sueño, en los reptiles no es más que el reposo determinado por la bajada nocturna en la temperatura corporal y los ritmos circadianos de actividad-reposo, pero sin relación con el verdadero sueño de los mamíferos.

Agradecimientos

Debo agradecer la ayuda y apoyo del equipo de Neurofisiología, del Departamento de Biología de la UIB, especialmente a Rubén V. Rial, por haberme ayudado a encaminar mi trabajo de fin de grado. Debo agradecer también la ayuda a Mourad Akaârîr, de la Universidad de las Islas Baleares, por la ayuda ofrecida acerca de la manipulación de los lacértidos en sus respectivos tratamientos.

Finalmente, doy gracias a mi novia Beatriz Calderón, a mi hermana Andrea Chahboun y a mis padres Gloria M^a Guasch y Ahmed Chahboun, quienes sin su paciencia y su apoyo incondicional no hubiera sido posible realizar el trabajo.

Bibliografía

1. Aserinsky, E., Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 118: 273-274.
2. Bruce Durie, D.J. Sleep in animals. In: Wheatley, D. (Ed.), *Psychopharmacology of Sleep*. Raven Press 1981; pp. 1-18, New York.
3. Castellanos R, Rossana MR, Frazer G. Efectos fisiológicos de las bebidas energizantes. *Rev Fac Cienc Méd* 2006; 1:43-49.
4. Consultado el 08 de febrero de 2012. <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Caffeine>.
5. Drapeau C, Hamel-Herbert I, Robillard R. Challenging sleep in aging: the effects of 200 mg of caffeine during the evening in young and middle-aged moderate caffeine consumers. *J Sleep Res* 2006; 15:133-141.
6. Elmenhorst D, Garibotto V, Prescher A, et al. Adenosine A (1) receptors in human brain and transfected CHO cells: Inhibition of [(3)H]CPFPX binding by adenosine and caffeine. *Neurosci Lett* 2011; 487:415-420.
7. Finnegan D. The health effects of stimulant drinks. *Nutrition Bulletin* 2003 Jun; 28 (2): 147–155.
8. Fisone, G; Borgkvist, A; Usiello, A. *Cellular and molecular life sciences*. 2004 Apr; 61(7-8):857-72.
9. Fredholm B, Bättig K, Holmén J, et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 1999; 51:84-125.
10. Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. and Zvartau, E.E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51, 83–133.
11. Glade MJ. Caffeine-Not just a stimulant. *Nutrition* 2010; 26:932-938.
12. Huang ZL, Qu W, Eguchi N, et al. Adenosine A₁, but not A_{2A}, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* 2005; 8:858-859.
13. Jones B.E., Cuello, A.C. Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic –catecholamine, serotonin and acetylcholine neurons. *Neuroscience* 1989; 31(1): 37-61.
14. Jouvet, M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology*, 1999; 21: 24-27
15. Lovallo W, Whitsett L, Alábsi M, et al. Caffeine Stimulation of Cortisol Secretion Across the Waking Hours in Relation to Caffeine Intake Levels. *Psychosom Med* 2005; 67: 734-739.
16. Medline Plus. La dieta y la cafeína. [Base de datos en Internet]. Bethesda [MD]; Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. [actualizado 8 de septiembre de 2005; citado 11 de febrero de 2006]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002445.htm>

- 17.**Pardo-Lozano R, Alvarez-García Y, Barral D, et al. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones* 2007; 19:225-238.
- 18.**Pieron, H. *Le problema physiologique du sommeil*. 1913; Paris: Masson.
- 19.**De Vera, L., González, J., Rial, R.V. Reptilian waking EEG: Slow waves, spindles and evoked potentials. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1994; 90: 298-303.
- 20.**Rial, R.V., Nicolau, M.C., Gamundí, A., Akaârîr, M., Aparicio, S., Garau, C., Tejada, S., Roca, C., Gené, L., Moranta, D., Esteban, S. The trivial function of sleep. *Sleep Medicine Reviews* 2007a; 11: 311-325.
- 21.**Rial, R.V., Nicolau, M.C., Gamundí, A., Akaârîr, M., Aparicio, S., Garau, C., Tejada, S., Roca, C., Gené, L., Moranta, D., Esteban, S. Sleep and wakefulness, trivial and non-trivial: Which is which? *Sleep Medicine Reviews* 2007b; 11: 411-417.
- 22.**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. Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2010; 35 (1): 1-126
- 23.**Sagaspe P, Taillard J, Chaumet G, et al. Aging and Nocturnal Driving: Better with Coffee or a Nap? A Randomized Study. *Sleep* 2007; 30: 1808-1813.
- 24.**Saper, B., Scammell, T.E., Lu, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 2005; 437: 1257-1263.
- 25.**Specterman M, Bhuiya A, Kuppuswamy A, Strutton PH, Catley M, Davey NJ. The effect of an energy drink containing glucose and caffeine on human corticospinal excitability. *Physiol Behav.* 2005 Jan 17; 83(5):723-8.