ARTÍCULO ORIGINAL

Revista Mexicana de Neurociencia
Mayo-Junio, 2009; 10(3): 184-194

Cambios en la vigilia y el sueño, relacionados al envejecimiento evaluados mediante un reto con cafeína en la rata F344

Salín-Pascual Rafael J,*,** Upadhyaya Urvashi,* Shiromani Priyattam J*

RESUMEN

Introducción: Una serie de cambios fisiológicos ocurren en el ciclo de sueño y vigilia a lo largo de la vida de los animales y seres humanos. Éstos, pueden estar vinculados a modificaciones en sistemas de neurotransmisión, en el número de células que están regulando los mecanismos de las fases del dormir y del despertar. Los cambios del sueño en el anciano sano son similares a los reportados en el insomnio psicofisiológico o primario. La posibilidad de que el sistema de neurotransmisión de las purinas, la adenosina, participe en estos cambios se investigó en el presente trabajo en donde se utilizó un modelo animal. Ratas F344, machos, fueron evaluadas con registros de sueño y retos con cafeína y vehículo. **Material y métodos:** Se estudiaron tres grupos de animales: ratas jóvenes (tres meses); ratas adultas (10 meses) y ratas viejas (20 meses) (N = 10 por grupo). Se les operó y se les colocaron electrodos fijos en cráneo y músculos de la nuca, para registros crónicos de sueño. Una semana después, se procedió a efectuar los registros basales y a continuación se procedió a la fase experimental. Ésta se hizo en dos etapas de experimentos. Administración de cafeína sin privación de sueño y Administración de cafeína con privación de sueño. Las inyecciones de cafeína (intraperitoneal I.P.) en dos dosis (10 y 20 mg/kg de peso) o vehículo (solución salina), se hicieron en todos los animales, con una semana de separación entre maniobra. La inyecciones se hicieron al inicio de la fase luminosa (7:00 h fase de mayor sueño en la rata) o fase de oscuridad (19:00 h fase de mayor actividad). Además los tres grupos se sometieron a privación de sueño, y la administración de cafeína y placebo (esto sólo en la fase de inicio de oscuridad). **Resultados:** Las ratas viejas fueron más sensibles al efecto de tipo estimulante de la cafeína, en ambas situaciones de inyección en la oscuridad o luminosidad, además la presión de sueño generada por la privación del dormir, se inhibió con cafeína en ambas dosis, en los grupos de ratas adultas y viejas, pero no ocurrió lo mismo en las jóvenes quienes presentaron rebote de sueño en la fase de oscuridad de manera independiente de la dosis de cafeína. **Conclusión:** Lo anterior permite proponer que hay cambios ontogénicos en el sistema de receptores a adenosina, y que éstos pueden ser por disminución en el número de estos receptores o en los mecanismos de segundos mensajeros.

Palabras clave: Adenosina, sueño, envejecimiento, cafeína, privación de sueño.

Changes in wakefulness and sleep, associated with aging as assessed by a challenge with caffeine in the rat F344

ABSTRACT

Introduction: *A series of physiological changes occur in the cycle of sleep and wakefulness throughout the life of animals and humans. They can be linked to changes in neurotransmission systems in the number of cells that are the mechanisms regulating the phases of sleep and waking. The changes of sleep in the healthy elderly are similar to those reported in primary or psychophysiological insomnia. The possibility that the system of neurotransmission of the purine, adenosine, is involved in these changes was investigated in this paper where we used an animal model. F344 rats, males were evaluated with sleep logs and challenges with caffeine and vehicle.* ***Material and methods:*** *We studied three groups of animals: young rats (three months), adult rats (10 months) and old rats (20 months) (N = 10 per group). They were operated and fixed electrodes were placed in the skull and neck muscles to record chronic sleep. A week later, it was proceeded to record the baseline and then proceeded to the pilot phase. This was done in two stages of experiments. Administration of caffeine without sleep deprivation and administration of caffeine with sleep deprivation. Injections of caffeine (IP) in two doses (10 and 20 mg/kg) or vehicle (saline) were made in all animals, with a week of separation maneuver. The injections were made at the beginning of the light phase (7:00 h more sleep phase in rats) or dark phase (19:00 h phase of increased activity). Besides, the three groups were subjected to sleep deprivation, and the administration of caffeine and placebo (this only during the beginning of darkness).* ***Results:*** *The old rats were more sensitive to the type of stimulant effect of caffeine in both cases of injection into the darkness or brightness, plus the pressure generated by the dream of sleep deprivation with caffeine was inhibited in both dose groups in adult and old rats, but not the same thing happened in the youth who presented sleep rebound during the dark of an independent in the dose of caffeine.* ***Conclusion:*** *This could indicate ontogenic changes in the system to adenosine receptors, and that these may be in decline in the number of these receptors or the mechanisms of second messengers.*

Key words: *Adenosine, sleep, aging, caffeine, sleep deprivation.*

INTRODUCCIÓN

En diferentes especies de animales se observa un patrón de disminución en el tiempo total de requerimientos de sueño y la profundidad del mismo. Por ejemplo, en los ancianos de nuestra especie, se observan las siguientes alteraciones: una latencia de inició a sueño prolongadas; una mayor fragmentación de sueño, con numero-

* West Roxbury VA Medical Center and Harvard Medical School, West Roxbury M.A.
** Departamento de Psicología, Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., México.

sos despertares y finalmente la terminación del episodio de sueño nocturno, más temprano de su horario convencional.[1-5] En cuanto a la arquitectura de sueño, el estadio con mayor afectación es el episodio de sueño delta (SD) (Estadio III y IV en el ser humano). Finalmente hay un patrón policíclico, de tal forma que el sueño y la vigilia se distribuyen de manera irregular a lo largo de un día, con episodios discretos de sueño a lo largo del día y episodios prolongados de despertares en la noche.

Por lo anterior mencionado, se pensó que el problema del sueño en el viejo, radicaba en una disminución del número de neuronas, ya sea en las áreas vinculadas al inicio y mantenimiento del sueño o de la regulación circadiana, pero esto se descartó, por una serie de estudios en los cuales se evaluaron los núcleos del hipotálamo anterior, en especial el Ventral Lateral Pre-Óptico (VLPO), en animales jóvenes y viejos (rata de tres meses como joven y vieja de 24 meses) y no se encontraron diferencias en cuanto al número de células, el fenotipo neuroquímico de las mismas o su capacidad de respuesta.[6,7] Otro complejo nuclear hipotalámico estudiado fue el núcleo supraquiasmático, el cual se ha documentado como el marcapaso o reloj circadiano endógeno. El estudio en animales de diferentes edades, no indica que este núcleo se encuentra con un funcionamiento deficiente en los animales seniles.[8-9]

El mecanismo que se exploró después, se inscribe en el modelo conocido como "Modelo de los dos procesos".[10,11] Uno de estos proceso es conocido como "C" de circadiano, que equivale a los horarios en los cuales las especies duermen mejor, es decir, con una mayor consolidación del sueño. Este proceso tiene una gran relevancia en las estrategias de adaptación entre las especies, con respecto a sus predadores, en donde se observa que las presas adoptan episodios opuestos a los animales que los predan. Por otro lado, el otro proceso es el identificado con la letra "S", de sueño. Éste es conocido también como el proceso homeostático. Ya que en la medida que mantenemos una calidad de vigilia elevada, acumulamos alguna sustancia, o grupo de ellas, o se activa algún mecanismo, que se acumula al estar despierto, y que se gasta durante el sueño. En los últimos años, se ha consolidado la hipótesis, de que el proceso "S", pueda estar relacionado con el neurotransmisor conocido como adenosina.[12-16] Esta última, tiene varia fuentes de origen a nivel del sistema nervioso, una de ellas, la ubica como un producto de la destrucción intracelular del glucógeno neuronal, con lo cual se establece una relación entre una actividad metabólica que se agota, y una fase de la quiescencia, en la cual se restituye el material generador de energía.[17,18]

La adenosina tiene, además, una serie de receptores en la membrana celular,[19-21] que al ser manipulados con fármacos, se obtienen inducción de sueño, si son agonistas de adenosina o la misma adenosina o el fenómeno opuesto se observa con los antagonistas.[22-24] Por ejemplo, los niveles de adenosina se observan elevados a nivel plasmático, al inicio del episodio de sueño nocturno en nuestra especie. En otras especies ocurre lo mismo como en la rata, a nivel de tejido cerebral, sólo que esto se observará al final del periodo de actividad de esta especie que es la oscuridad. Lo anterior nos señala que la adenosina tiene un patrón de aumento y disminución, acoplado a periodos de actividad y reposo, además de que éstos son independientes del ciclo de luz-oscuridad, pero acoplados al de actividad y reposo.[18]

En la medida que transcurre un episodio del sueño largo, los niveles de adenosina se reducen. En animales privados de sueño,[23] se observó que los niveles de adenosina no disminuyen, hasta que se presentó un episodio largo de sueño. La administración de adenosina sistémica o con inyecciones intracerebrales en la zona del núcleo ventral anterior del hipotálamo (VLPO), llevan a un incremento de somnolencia, y a un aumento en la cantidad de sueño delta.[25,26] También los antagonistas no-selectivos y selectivos producen un efecto opuesto, esto es alertamiento, y la sensación de recuperación de energía o recuperación. Los efectos descritos previamente son mediados por una serie de receptores localizados en las membranas celulares. En el caso del receptor A-1, éste al ser estimulado por su ligando endógeno o agonistas, activa un sistema de segundos mensajeros (sistema adenenilato ciclasa inhibidora), el cual es responsable de cambios en la conductancia iónica, situación que se explica por la activación de canales de potasio y calcio, ambos sensibles a voltaje.[27] Los receptores A-1 inhiben las neuronas colinérgicas en el mesencéfalo. Utilizando las técnicas de microdiálisis inversa, agregando adenosina en el hipotálamo anterior, se observó la inducción de sueño extra, en animales que ya habían tenido episodios de sueño previos y que estaban, por lo tanto, sin necesidad de un nuevo episodio de sueño.[16,28]

El receptor a adenosina A-2 tiene una menor afinidad (Kd) por su ligando endógeno, en comparación con los A-1. Este receptor, al estimularse, activa mecanismos vinculados a la adenilato ciclasa estimulante (AMPc-e), que finalmente aumenta los niveles del segundo mensajero, el AMPc. Hay dos subtipos de receptores a adenosina del tipo dos: A2a, A2b. En estudios recientes, se han detectado cambios de los receptores de adenosina con la edad, a la baja en respuesta, pero esto no se ha correlacionado con el ciclo sueño y vigilia.[28,29]

En nuestro grupo, se encontró que los niveles de adenosina cerebral extracelular están por arriba de lo en-

contrado en las ratas jóvenes, empleando el procedimiento de microdiálisis en animales en libre movimiento.[30] Por lo que es de interés el explorar el estado de los receptores adenosina, como resultado de estos niveles elevados de adenosina en las ratas viejas.

La cafeína es un antagonista de ambos subtipos de receptores, tanto en A1 como el A2, aun cuando tienen más efecto sobre el receptor A2a.[31-33] La cafeína es un agente promotor de la vigilia, con un patrón de alertamiento que sigue el modelo dosis-respuesta.[34] En humanos sensibles a la xantinas que reciben cafeína en la mañana, se produce una disminución de la banda del espectro delta y fragmentación del sueño nocturno. La cafeína es la sustancia que más se emplea para promover el estado de despierto, en las condiciones de deficiencia de sueño nocturno, durante privación o poca calidad de sueño nocturno. Por ejemplo, después de 49 horas de vigilia prolongadas, se administraron diferentes dosis de cafeína o placebo, a voluntarios sanos, en un diseño controlado. Después de la cafeína o placebo se persistió por 12 horas más de vigilia, Después de la cafeína, la latencia a sueño, la calificación de las escalas de somnolencia, y el tiempo de reacción, mostraron una respuesta de dosis dependiente. Las dosis elevadas de cafeína modificaron hacia el alertamiento los parámetros estudiados, en comparación con la administración de placebo.[36-38]

La administración de cafeína no sólo afecta a la adenosina, ni tampoco actúa en exclusiva en el núcleo VLPO. La administración de cafeína y la evaluación con autorradiografías y el empleo de [14C]-des-oxi glucosa mostró un aumento en la utilización de glucosa en la corteza cerebral en la rata. A la dosis de 1 mg/kg hay activación del núcleo caudado, los núcleos del rafé pontino y del Locus Coeruleus en médula oblongada. Después de 2.5 a 5.0 mg/kg. La activación se generaliza a otros componentes del sistema nigro estriatal, que transmite con dopamina, el tálamo ventral tegmental y áreas de la amígdala pontina. Es pues factible que sistemas de neurotransmisión como la dopamina, serotonina y norepinefrina, sean activados por cafeína.[38-41] Estos sistemas y las regiones activadas por cafeína, son parte de las estructuras que intervienen en los mecanismos de la reacción de despertar, de la atención, y del mantenimiento tónico de la vigilia.[42]

Una manera de evaluar la funcionalidad del sistema de adenosina a lo largo de la vida de un animal es mediante el reto farmacológico con cafeína, y medir los efectos en las variables del sueño y vigilia. La pregunta a contestar fue: ¿Hay cambios en el patrón de respuesta de alertamiento de la cafeína con la edad en la rata? En caso de que la respuesta sea afirmativa, la siguiente pregunta sería: ¿si uno de los mecanismos de esto es la sensibilidad y/o el número de receptores? Para contestar a ambas preguntas se diseñó el presente estudio. En el cual se administró cafeína en diferentes dosis y placebo, a ratas jóvenes, de edad adulta y ancianas. La hipótesis central del presente trabajo fue que la sensibilidad hacia la cafeína en su efecto de inducir vigilia, aumenta con la edad.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron ratas macho de la variedad F344, obtenidas del proveedor (National Institute of Aging-USA). Los animales llegaron al bioterio en las condiciones requeridas para su estudio y en tres grupos: ratas jóvenes (tres meses); ratas adultas (10 meses) y ratas ancianas (20 meses). Los grupos estuvieron conformados por 10 animales en cada uno de ellos. Se les permitió adaptarse a las condiciones del bioterio anexo al laboratorio por una semana. Durante este periodo los animales permanecieron en condiciones constantes del ciclo luz oscuridad (12-12), iniciando a las 7:00 h la fase luminosa y terminando a las 19:00 h. La temperatura se mantuvo regulada a 25 ^{0}C, y se les proporcionó agua y alimento *Ad libitum*. Desde que llegaron hasta el momento de la instrumentación quirúrgica, se permitió que estuvieran cinco animales por caja. En todo momento se siguieron las normas éticas para el manejo de animales experimentales.

Los animales fueron implantados para registró crónico de sueño, bajo el siguiente procedimiento: Bajo anestesia general, mediante una mezcla de agentes farmacológicos (acepromacina [0.75 mg mg/kg], Xilasina [2.5 mg/kg, y ketamina [22 mg/kg]), mismos que se administraron de manera intramuscular. Se colocó al animal dormido en el estereotáxico y se procedió a la implantación de electrodos de cráneo, los cuales son tornillos miniatura que tienen cables aislados. Los tornillos se insertaron 2 mm a ambos lados de la línea central, por fuera del seno venoso sagital, y 3 mm delante de Bregma (corteza frontal). Los otros dos electrodos se colocaron 6 mm atrás de bregma (corteza occipital). Estos cuatro electrodos recolectaron la señal electroencefalográfica (EEG), derivando los electrodos entre sí por regiones (Vg., frontal con frontal, derecho e izquierdo). La actividad muscular (electromiograma-EMG) se midió con dos alambres blindados y con las puntas libres, insertados de manera bilateral en los músculos de la nuca. Los seis alambres fueron soldados a un conector de amfenol, que se fijó al cráneo con cemento dental del tipo acrílico. Se suturó la herida de la piel de cráneo, y se permitió la recuperación de los animales por dos semanas. En esta fase posquirúrgica, los animales fueron colocados de manera individual, con lo cual se minimiza la posibilidad de

que entre sí se retiren la preparación quirúrgica. Las cajas de almacenamiento fueron de plexiglas, transparente y en todo el proceso se cuidó de que la temperatura, agua y alimento fueran como en la fase prequirúrgica. Antes de iniciar los registros de sueño basales se examinó a los animales en el área de implantación, por signos de infección, misma que no se detectó en ninguno de ellos.

Registros polisomnográficos-medidas basales de sueño

Dos semanas después de la cirugía se inició la fase de adaptación a las condiciones de registro de sueño, para esto al conector fijo (del tipo "hembra") en el cráneo de los animales se le insertó otro conector "macho", del cual surge la "trenza" de cables, que van a los sistemas de registro digitales. Por 48 horas no se hizo ningún registro, sólo se les permitió adaptarse a esas nuevas condiciones. Los registros basales se llevaron a cabo de manera inmediata, por dos días continuos, y al calificar esas 48 horas, se hizo un promedio de las variables de sueño que funcionaron como el basal o la línea base de comparación del antes y después de las maniobras que se llevaron a cabo. Al tercer día de estudio, se les privó de sueño por seis horas de las 13:00 h a las 19:00 h, mediante la manipulación gentil de los animales, sin permitir que durmieran, durante este proceso, los animales permanecieron conectados al polisomnógrafo, para constatar la validez de la maniobra de privación de sueño. Al finalizar la misma, se permitió un registro extra de 12 horas en la fase de oscuridad, para evaluar el fenómeno de recuperación ante la privación moderada de sueño.

Administración de cafeína

Una semana después de los registros de sueño basales y de la privación de seis horas de sueño (basal sin cafeína o salina), se procedió a las inyecciones de cafeína o solución salina. Los animales recibieron cafeína en dosis de 10 y 20 mg/kg de peso, y solución salina, en un diseño de cuadrados latinos, aleatorizado, en donde todas las ratas fueron eyectadas con las dos dosis de cafeína y el vehículo aun cuando no en el mismo orden de asignación, lo anterior para detectar la posibilidad de un efecto residual de cafeína en las inyecciones de vehículo. Entre una inyección y los registros de sueño posteriores se marcó un intervalo de una semana. Las inyecciones se administraron 30 minutos antes del inicio de la fase de oscuridad de los animales (periodo de actividad), y se procedió a un registro de 12 horas en esta fase de oscuridad. Dos semanas después de esta fase, los animales repitieron el esquema de inyecciones, pero en esta ocasión, media hora antes del inicio de la fase luminosa (7:00 h) y de sueño de las ratas,

Una tercera maniobra experimental se hizo con los animales privados de sueño, por seis horas, de las 13:00 a las 19:00 h, y la inyección de cafeína o de vehículo se hizo a las 18:30 h. Y se permitió un registro de sueño de 12 horas en el periodo de oscuridad.

Análisis de los datos de sueño

Se utilizaron derivaciones EEG contra-laterales de los electrodos frontales y occipitales, para la adquisición de la señal EEG. Ésta fue filtrada a 70 Hz (filtro de baja frecuencia) y a 0.3 Hz (filtro de bajas frecuencias). Se empleó un equipo Grass como amplificador y pre-amplificador, con un muestreo continuo de 128 Hz. El cual se almacenó en una unidad de disco óptico. Se efectuó la calificación de los estadios del sueño de manera manual, por un técnico que desconoció el tipo de estudio que se realizaba y, por lo tanto, se le consideró "ciego" a las maniobras experimentales. Un programa para calificar y hacer los procedimientos estadísticos correspondientes fue empleado. Se trata del programa Icelus, desarrollado por la Sleep Research Society (Mark Opp). Este programa califica en épocas polisomnográficas de12 segundos, estas épocas se despliegan en el monitor de una OC, y es ahí que el técnico hace la decisión sobre el estadio que predomina en esos 12 segundos.

La vigilia se identificó por la presencia de la desincronización EEG, y una actividad muscular elevada; el sueño de ondas lentas, por una amplitud mayor de las ondas EEG, y un tono muscular bajo o inmóvil., El sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), se identificó por la presencia en el EEG de una actividad theta regular, acoplada a una atonía muscular. La cantidad de tiempo que los animales permanecen en estas tres fases (Vg., vigilia, sueño de ondas lentas y sueño MOR), fue determinadas para las 48 h, de registro basal, y luego promediadas para obtener un registro basal tipo de cada animal de 24 h. Se determinó el índice entre la actividad o vigilia y de sueño, en los periodos de oscuridad y luminosidad. El análisis de los espectro de las bandas de frecuencia se calculó utilizando un programa ICELUS, que trabaja con frecuencias rápidas y emplea la transformada rápida de Fourier.

Una vez que se tuvo todo los registros de sueño calificados y terminado el estudio, se abrieron los códigos de los registros de sueño calificados, y se procedió a dos tipos de comparación. Por un lado cada grupo de ratas contra sí mismas, en un basal y las maniobras efectuadas intragrupo. En un segundo análisis se procedió a un análisis de varianza de dos vías comparando los grupos entre sí y la maniobra farmacológica administrada, Se utilizó

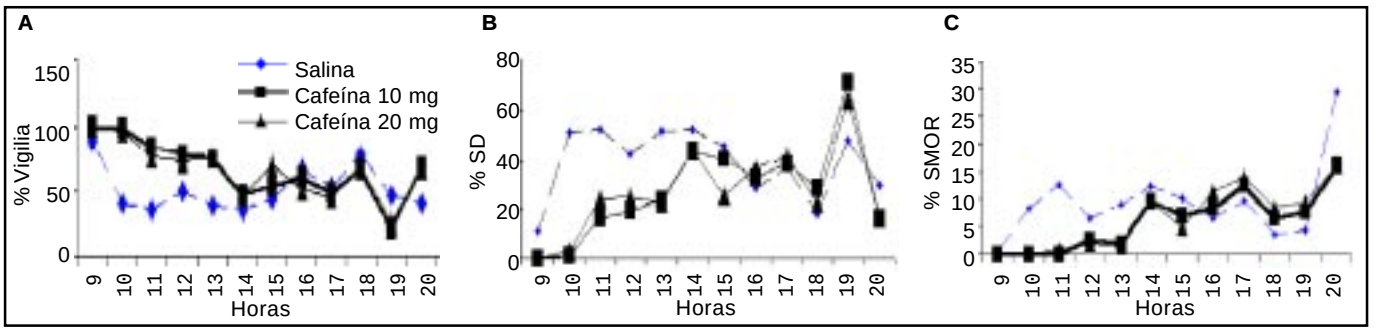

Figura 1. Administración diurna de cafeína en ratas jóvenes. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

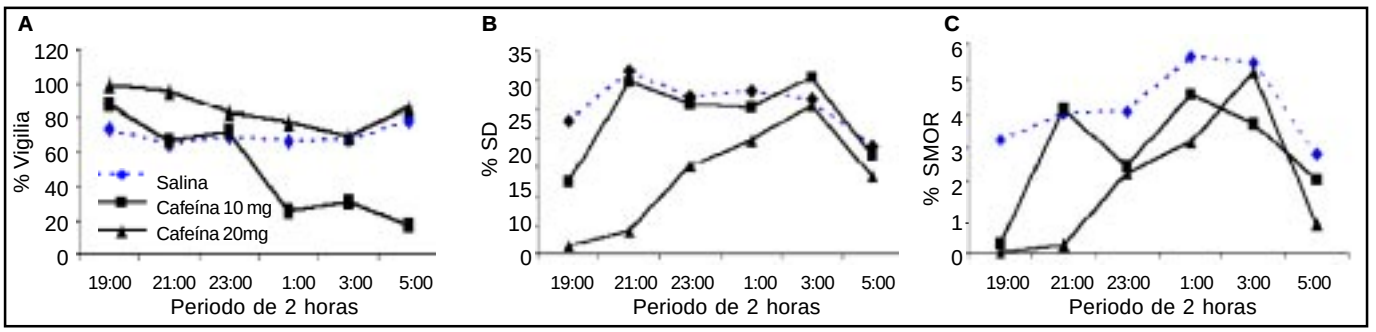

Figura 2. Administración nocturna de cafeína en Ratas jóvenes. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

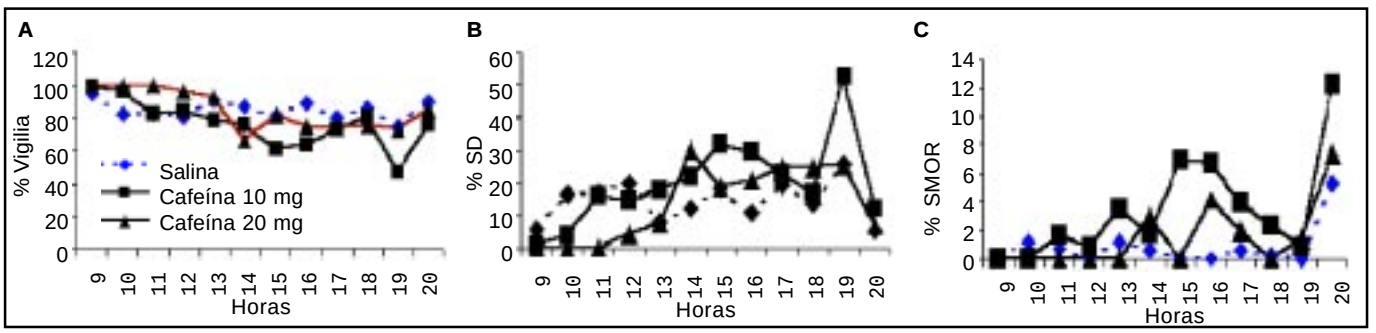

Figura 3. Administración diurna de cafeína en ratas adultas. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

además del ANOVA de dos vías una prueba de "t" de Student como análisis *post hoc*, con la corrección de Bonferroni. La significancia estadística se fijó para una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Administración de cafeína en animales jóvenes

La administración nocturna, así como la diurna cafeína y sus efectos se muestran en las figuras 1 y 2. Se observó una respuesta dependiente de la dosis, tanto en el estar despierto como las variables de sueño. El estar despierto se aumentó, sobre todo, con ambas dosis de cafeína en comparación con la inyección de vehículo. (ANOVA de Dos-vías: Tiempo x Tratamiento: $F = 3.54$; $p < 0.04$ y $F = 8.85$, $p < 0.006$), al mismo tiempo se observó una reducción del tiempo de sueño delta (Tiempo: $F = 2.96$; $p < 0.06$ y Tratamiento: $F = 8.53$; $p < 0.007$) y del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) ($F = 6.06$; $p < 0.008$ y tratamiento $F = 7.9$; $p < 0.009$).

Lo mismo ocurrió durante la administración diurna de café. El tiempo de vigilia se observó, por arriba con respecto al registro basal (Tiempo: $F = 3.25$; $p < 009$ y tratamiento: $F = 3.98$; $p < 0.003$). En paralelo se observó una disminución de sueño delta (Time: $F = 3.86$; $p < 0.003$ y Tratamiento: $F = 3.97$; $p = 0.03$) y sueño MOR, pero sin que éste llegara a niveles significativos (Tiempo: $F = 5.76$;

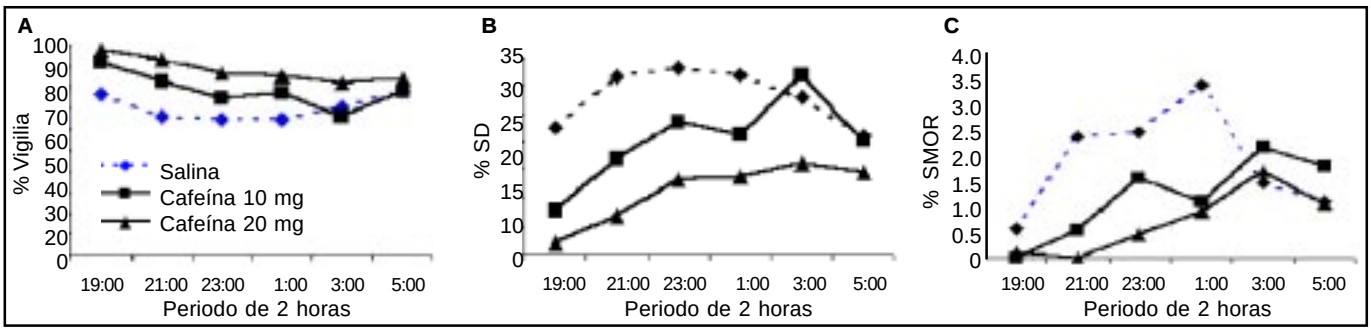

Figura 4. Administración nocturna de cafeína en ratas adultas. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

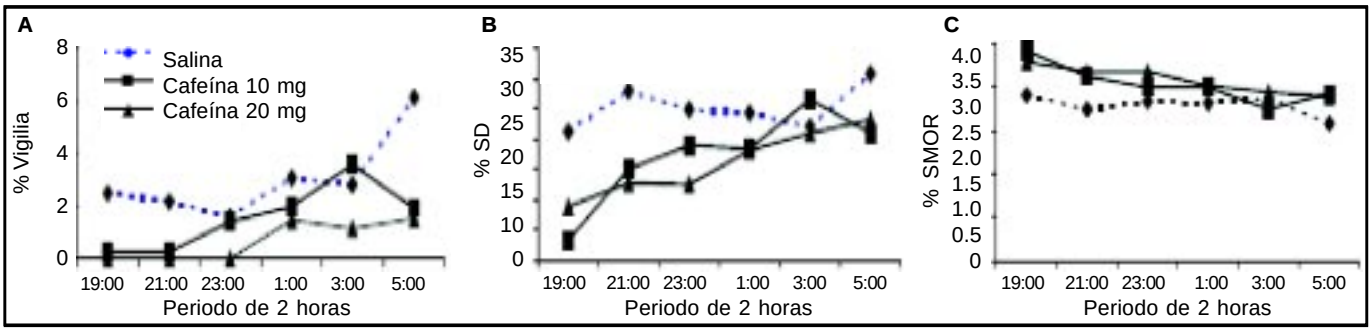

Figura 5. Administración nocturna de cafeína en ratas viejas. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

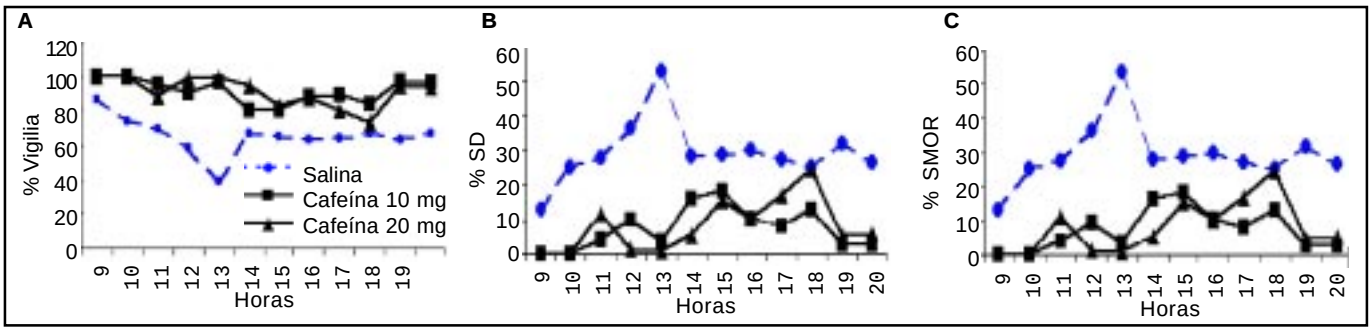

Figura 6. Administración diurna de cafeína en ratas viejas. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

$p < 0.001$ y Tratamiento: $F = 2.95$; $p < 0.07$). Las diferencias estadísticas se observaron principalmente entre las dosis de cafeína y el vehículo, pero no entre la dosis baja y la alta de cafeína (Figuras 3 y 4).

Administración de cafeína en animales adultos

La administración nocturna de cafeína produjo un aumento en vigilia y la reducción del sueño de las variables tanto en la noche como al día siguiente en la vigilia (Figuras 5 y 6). La elección nocturna incrementó la vigilia y ambas fases de sueño, delta y sueño MOR. Las ANOVAs para la inyección nocturna que fue significativa se muestran a continuación. (Tiempo: $F = 4.02$; $p < 0.02$ y tratamiento: $F = 19.9$; $p < 0.001$) y una reducción en SD (Tiempo: $F = 4.14$; $p = 0.02$ y Tratamiento: $F = 22.06$; $p < 0.0001$) y del sueño MOR (Tiempo: $F = 1.98$; $p < 0.16$ y Tratamiento: $F = 4.04$; $p < 0.05$). Lo mismo se observó durante la administración de cafeína al inicio del periodo luminoso, pero sin ser significativas las diferencias.

Administración de cafeína en ratas viejas

Esta maniobra dio como resultado un aumento del estado de alerta y como una baja en ambas variables de sueño, en ambas fases de inyecciones (Vg., Diur-

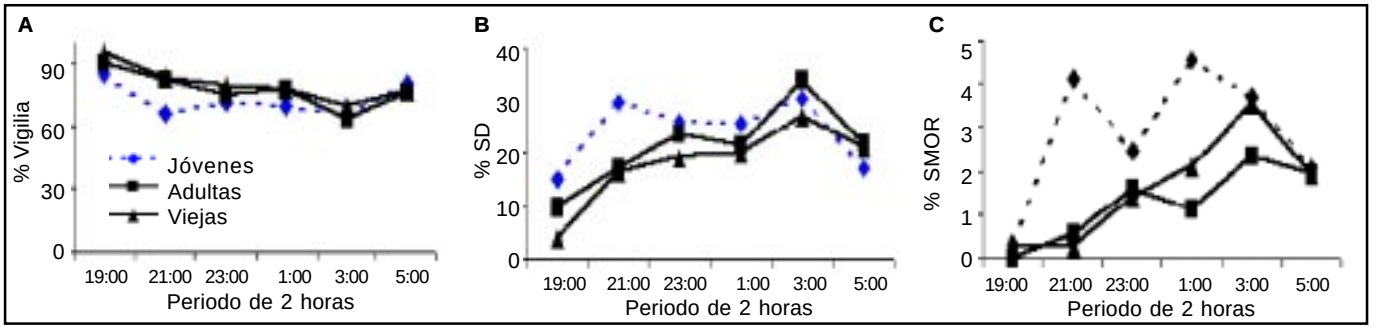

Figura 7. Cafeína 10 mg-3 grupos, administración nocturna. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

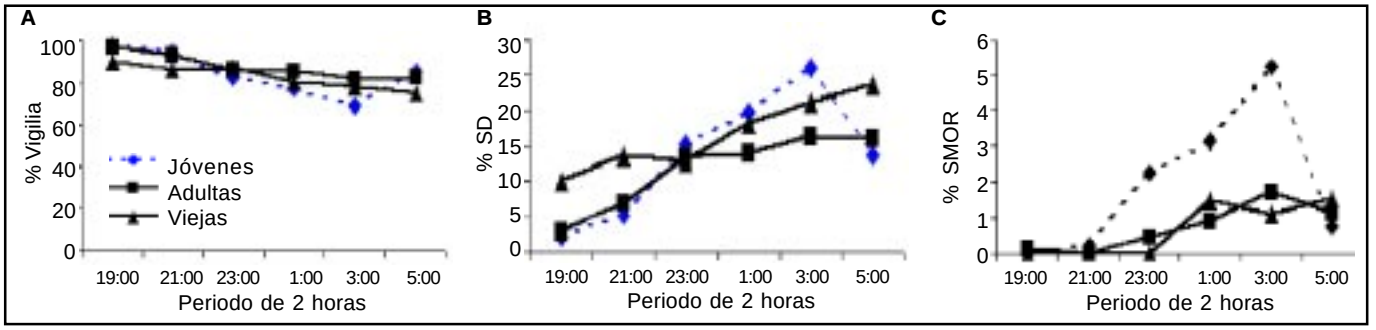

Figura 8. Cafeína 20 mg-3 grupos, administración nocturna. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

nas/Nocturnas) (Figuras 7 y 8). Variables nocturnas, (Tiempo: $F = 4.24$; $p < 0.02$ y tratamiento: $F = 10.0$; $p < 0.004$) y una reducción en SD (Tiempo: $F = 3.97$; $p < 0.03$; tratamiento: $F = 8.49$; $p = 0.007$) y sueño MOR (Tiempo: $F = 3.48$; $p < 0.04$ y Tratamiento: $F = 9.96$; $p < 0.004$). El mismo nivel de cambio se observó en la fase luminosa. Mayor tiempo despierto para las dos dosis de cafeína (Tiempo: $F = 14.02$; $p < 0.0001$ y tratamiento: $F = 29.38$; $p < 0.0001$) y una reducción en las dos fases de sueño. Sueño Delta (Tiempo: $F = 21.9$; $p < 0.0001$ y Tratamiento: $F = 12.85$; $p < 0.0001$) y sueño MOR (Tiempo: $F = 5.95$; $p < 0.003$ y Tratamiento: $F = 28.9$; $p < 0.0001$).

La administración de cafeína en los tres grupos

La comparación entre los tres grupos de edades diferentes, cuando recibieron cafeína al inicio del periodo luminoso mostró una clara diferencia del efecto alertante hacia los animales viejos. La vigilia se aumentó en las ratas Viejas en las dos dosis de cafeína. La cafeína10 mg (Tiempo: $F = 12.89$; $p < 0.001$ y Edad: $F = 14.03$; $p < 0.001$) y para cafeína 20 mg (Tiempo: $F = 6.77$; $p < 0.005$ y Edad: $F = 9.13$; $p < 0.006$). El SD bajó en ambas dosis de cafeína en las ratas Viejas. Al administrar cafeína 10 mg (Tiempo: $F = 15.02$; $p < 0.001$ y Edad: $F = 17.8$; $p < 0.001$) y cafeína 20 mg (Time: $F = 5.78$; $p < 0.009$ y Edad: $F = 6.88$; $p < 0.01$).

Finalmente el sueño MOR estuvo afectado en paralelo al SD, con una disminución con las dosis de cafeína de 10 mg (Tiempo: $F = 5.65$; $p < 0.01$ y Edad: $F = 4.9$; $p < 0.03$) y de cafeína 20 mg (Tiempo: $F = 2.43$; $p < 0.1$ y Edad): $F = 5.8$; $p < 0.02$). Éstos fueron mayormente afectados en comparación con los otros dos grupos (Figuras 7 y 8). Ambas dosis de cafeína aumentaron los tiempos de vigilia y redujeron ambas fases de sueño, las dos situaciones de administración de cafeína.

Las diferencias fueron entre el grupo de ratas viejas y los otros dos grupos.

Cuando la cafeína se administró a los tres grupos al inicio de la oscuridad (la fase de actividad de las ratas) también pudo apreciarse una diferencia significativa y gradual en los animales viejos (Figuras 9 y 10). La vigilia se aumentó en las ratas adultas y viejas, con cafeína 10 mg (Tiempo: $F = 15.85$; $p < 0.0001$ y Edad: $F = 3.3$; $p < 0.03$) pero no se observan diferencias entre los grupos con cafeína 20 mg en el estado de alertamiento (Tiempo: $F = 32.7$; $p < 0.001$ y Edad: $F = 2.33$; $p = 0.09$). No se observaron cambios en SD en la comparación de los tres grupos en la inyección nocturna. El efecto sobre el sueño MOR, fue diferenciado en función de la edad

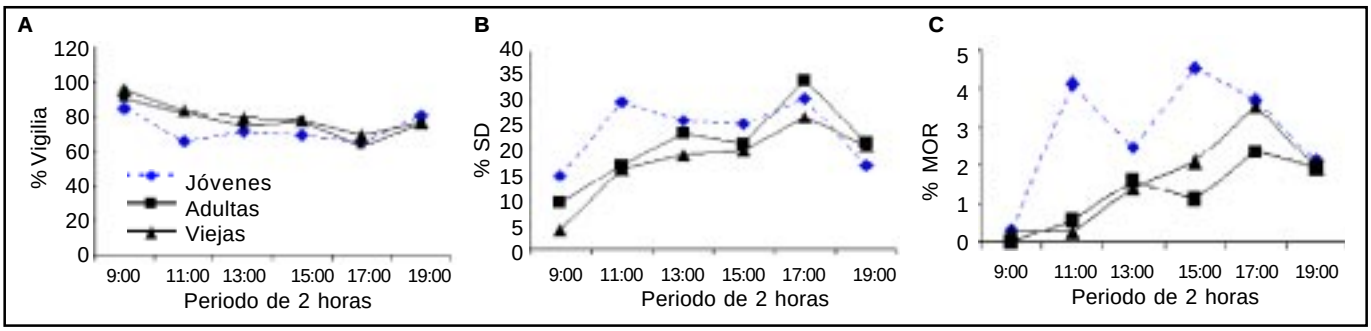

Figura 9. Cafeína 10 mg-3 grupos, administración diurna. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

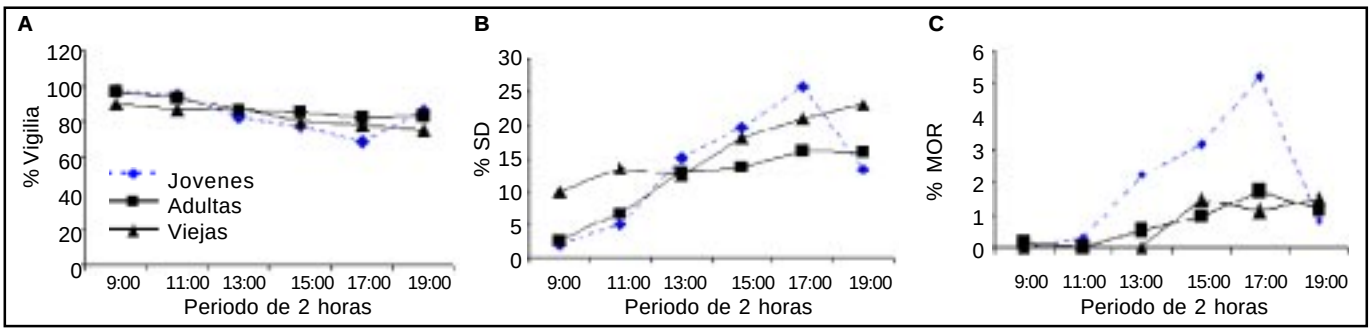

Figura 10. Cafeína 20 mg-3 grupos, administación diurna. **A.** % Vigilia. **B.** % Sueño delta. **C.** % Sueño de movimientos oculares rápidos.

Tabla 1
Privación total de sueño (6 h) y administración de cafeína al inicio de la fase de oscuridad (N = 6 animales por grupo)

	Basal	*Salina*	*10 mg cafeína*	*20 mg cafeína*
Jóvenes				
SMOR	*3.09 ± 1.3*	*5.25 ± 2.5**	*2.0 ± 1.8*	*3.6 ± 3.9*
SD	*21.5 ± 4.7*	*33.3 ± 5.3***	*38.0 ± 7.6***	*17.5 ± 8.6*
Vigilia	*75.3 ± 6.06*	*61.3 ± 7.6***	*59.9 ± 8.1***	*78.7 ± 12.5*
Adultas				
SMOR	*1.32 ± 0.6*	*5.05 ± 3.4**	*1,92 ± 1.6*	*2.9 ± 1.9*
SD	*20.76 ± 4.9*	*25.8 ± 12.2*	*19.28 ± 5.2*	*20.72 ± 5.3*
Vigilia	*77.91 ± 5.5*	*69.08 ± 15.06*	*78.79 ± 6.5*	*76.4 ± 6.7*
Viejas				
SMOR	*1.79 ± 0.9*	*2.68 ± 3.8*	*6.3 ± 4.3**	*5.7 ± 4.7*
SD	*20 ± 4.3*	*36.9 ± 6.8***	*32.6 ± 8.9**	*32.4 ± 8.9**
Vigilia	*78.1 ± 5.1*	*60.3 ± 9.4***	*60.9 ± 12.5**	*62.2 ± 13.0**

** $p < 0.05$ Student 't" test; ** $p < 0.01$*

nuevamente las ratas viejas tuvieron una mayor supresión de los otros dos grupos. La cafeína 10 mg (Tiempo: $F = 11.47$; $p < 0.001$ y Edad: 6.14; $p < 0.003$) y cafeína 20 mg (Tiempo: $F = 16.73$; $p < 0.001$ y Edad: $F = 7.77$; $p < 0.001$).

Efectos de la privación de sueño

Después de seis horas de privación de sueño total, se permitió la recuperación de los animales por 12 horas los observaron diferencias en la recuperación en los tres grupos de animales, utilizando las variables de arquitectura de sueño. En la tabla 1 se muestran los valores del fenómeno de la recuperación a la privación de sueño en los tres grupos de animales, por las tres dosis de inyecciones: Salina, 10 mg y 20 mg de cafeína. Los animales jóvenes después de la inyección de vehículo mostraron un aumento significativo tanto de sueño delta como un sueño MOR, además de una baja en el número de despertares. Cuando recibieron cafeína

en ambas dosis, si bien se redujeron los tiempos de sueño comparados con solución Salina, no llegaron hacer significativo.

Los animales de edad media presentan una recuperación a la privación de sueño principalmente en sueño MOR, con la administración del vehículo. Las dos dosis de cafeína impidieron un incremento de la misma magnitud que la observada en a los animales jóvenes. Finalmente los animales viejos, después de la privación de sueño y la administración del vehículo mostraron un incrementó no significativo de las variables de sueño, mientras que ambas dosis de cafeína fueron suficientes para suprimir el aumento de las fases de sueño como lo observado en los animales jóvenes.

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio fueron los siguientes:

1. Reducción, en un modelo dosis dependiente de las variables de sueño en los tres grupos con las dos dosis de cafeína, en comparación con la inyección de solución salina.
2. Un efecto significativo de la café en el dependiente de la edad, con una mayor inducción de vigilia en los animales viejos en comparación con los otros dos grupos.
3. Un efecto supresor del incremento de sueño como resultado de la privación del mismo como al administrar cafeína en los animales de edad media y viejos.

   El principal hallazgo es la modificación al mecanismo de alertamiento inducido por cafeína con las ratas viejas, y que se aprecia ya en sus inicios en las ratas adultas. Lo anterior apunta a que, en función de que el efecto alertante de cafeína es mediado por el bloqueo de los receptores a adenosina, a que exista un defecto o baja de actividad de este sistema en la medida que la rata envejece.

En nuestro laboratorio se ha reportado previamente que la medición de adenosina extracelular en los núcleos del hipotálamo anterior, mostraron una mayor cantidad de adenosina en las ratas viejas en comparación de los otros dos grupos.[43] La posibilidad de que algunos cambios en el número o afinidad de los receptores para adenosina, será corroborado de manera parcial para los receptores A-1 que se han encontrado disminuidos en el hipocampo de animales viejos. Una especulación de los resultados del presente trabajo puede ser que los animales viejos posean menos receptores o menor actividad de los mismos, también es posible que se observen al mismo tiempo estas dos posibilidades.

Ya se ha mencionado que el café también puede afectar otros sistemas del neurotransmisor, además de la adenosina. Por ejemplo, se ha reportado un aumento de adrenalina, después de su administración en seres humanos[44-46] el mecanismo sobre la elección de despertar se puede haber reforzado, por una liberación de acetilcolina.[47,48] Se tienen referencias de que cafeína activa ciertas estructuras del sistema nervioso central, como son el núcleo caudado, esto explica el aumento de la actividad motora en animales que reciben cafeína, también hay un aumento en los núcleos del rafé y del Locus Coeruleus.[44-54] Después de la administración de 2.5 a 5 mg/kg de cafeína, la activación metabólica será generalizada a otros componentes del sistema nigroestriatal, tálamo, áreas ventrales tegmentales de la amígdala. Todo lo anterior se correlaciona con los fenómenos conductuales y de sueño reportados con cafeína, y apoya una serie de efectos diferentes, de cafeína, además del ya mencionado para la adenosina. Todos ellos actúan en la promoción del estado de despierto.

La privación de sueño se comportó como lo ya reportado por otros investigadores, esto es una supresión del sueño MOR, y del sueño delta, pero, sobre todo, en animales jóvenes. Las ratas del primer día tuvieron un efecto moderado sobre la supresión del aumento de sueño por privación del mismo. Mientras que en las ratas viejas la cafeína en ambas dosis suprimió el fenómenos de rebote de sueño.

También se mencionó ya que mediante la técnica de microdiálisis en ratas viejas, la producción de este neurotransmisor, se encontró elevada durante la vigilia. Al mismo tiempo, cuando los animales fueron privados de sueño y se midió adenosina se pudo comprobar que los animales viejos tenían varios órdenes de magnitud de adenosina, por arriba de las ratas jóvenes. La pregunta que sigue es: ¿cómo es posible que teniendo más adenosina, se duerma en peores condiciones? En un estudio reciente, los niveles de actividad y cantidad de los receptores A-1, se encontraron disminuidos de tal manera que si esto se corrobora, la elevación de adenosina podría ser el resultado de una regulación hacia abajo, y cambios en la sensibilidad de los receptores adenosina como resultado del exceso de adenosina.[55,56]

La dieta baja en calorías se ha propuesto como un agente que retrasa los procesos de envejecimiento, pero por su grupo, por estar interesado en los eventos relacionados con sueño y vejez, nos decidimos estudiar animales viejos con dieta normal y viejos con dieta baja en calorías. La hipótesis de trabajo fue que si estos animales tenían

dieta hipocalórica, como protectora del envejecimiento, era posible entonces asesorar este efecto y por lo conocido que es el proceso de disminución de la cantidad y calidad de sueño se estudiaron ratas viejas, de 21 meses de edad, machos, F344. La reducción en calorías a lo largo de la vida de los animales fue de 60%. Se estudiaron cuatro grupos de ratas jóvenes y viejas; además con dieta baja en calorías y dieta normal. Los resultados mostraron que el proceso de envejecimiento del sueño no se ve afectado por este tipo de dieta.[57,58] Lo cual puede llevar a pensar en un programa de envejecimiento obligado del cerebro.

CONCLUSIONES

La adenosina es una de las moléculas que intervienen en la profundidad de dormir y al mismo tiempo en el restablecimiento de los niveles de energía cerebral, la detección de este fenómeno, y más adelante la corrección o modificación de los diferentes receptores para inducir sueño en el sistema de adenosina u otros, puede brindar posibilidades terapéuticas, quizá para enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas, las cuales puedan verse beneficiadas con sueño realmente profundo y reparado.

REFERENCIAS

1. *Bephage G. Promoting quality sleep in older people: the nursing care role. Br J Nurs 2005; 14(4): 205-10.*
2. *Kloppel S, Kovacs GG, Voigtlander T, Wanschitz J, et al. Serotonergic nuclei of the raphe are not affected in human ageing. Neuroreport 2001; 12(4): 669-71.*
3. *Rocha FL, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JO, et al. Prevalence of sleep complaints and associated factors in community-dwelling older people in Brazil: the Bambui Health and Ageing Study (BHAS). Sleep Med 2002; 3(3): 231-8.*
4. *Rumble R, Morgan K. Hypnotics, sleep, and mortality in elderly people. J Am Geriatr Soc 1992; 40(8): 787-91.*
5. *Sharma VK, Saxena MS. Climacteric symptoms: a study in the Indian context. Maturitas 1981; 3(1): 11-20.*
6. *Greco MA, Lu J, Wagner D, Shiromani PJ. c-Fos expression in the cholinergic basal forebrain after enforced wakefulness and recovery sleep. Neuroreport 2000; 11(3): 437-40.*
7. *Lu J, Shiromani P, Saper CB. Retinal input to the sleep-active ventrolateral preoptic nucleus in the rat. Neuroscience 1999; 93(1): 209-14.*
8. *Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. J Neurosci 2000; 20(10): 3830-42.*
9. *Shiromani PJ, Schwartz WJ. Towards a molecular biology of the circadian clock and sleep of mammals. Adv Neuroimmunol 1995; 5(2): 217-30.*
10. *Achermann P. The two-process model of sleep regulation revisited. Aviat Space Environ Med 2004; 75(3 Suppl.): A37-A43.*
11. *Alexander SP. Flavonoids as antagonists at A1 adenosine receptors. Phytother Res 2006; 20(11): 1009-12.*
12. *Szymusiak R, Gvilia I, McGinty D. Hypothalamic control of sleep. Sleep Med 2007; 8(4): 291-301.*
13. *McCarley RW. Neurobiology of REM and NREM sleep. Sleep Med 2007; 8(4): 302-30.*
14. *Elmenhorst D, Meyer PT, Winz OH, Matusch A, et al. Sleep deprivation increases A1 adenosine receptor binding in the human brain: a positron emission tomography study. J Neurosci 2007; 27(9): 2410-15.*
15. *Heller HC. A global rather than local role for adenosine in sleep homeostasis. Sleep 2006; 29(11): 1382-3.*
16. *Blanco-Centurion C, Xu M, Murillo-Rodriguez E, Gerashchenko D, et al. Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain. J Neurosci 2006; 26(31): 8092-100.*
17. *az-Munoz M, Hernandez-Munoz R, Suarez J, Vidrio S, et al. Correlation between blood adenosine metabolism and sleep in humans. Sleep Res Online 1999; 2(2): 33-41.*
18. *Chagoya DSV. Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms? Can J Physiol Pharmacol 1995; 73(3): 339-55.*
19. *Retey JV, Adam M, Khatami R, Luhmann UF, et al. A Genetic Variation in the Adenosine A(2A) Receptor Gene (ADORA2A) Contributes to Individual Sensitivity to Caffeine Effects on Sleep. Clin Pharmacol Ther 2007; 81(5): 692-8.*
20. *Hong ZY, Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, et al. An adenosine A receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats. J Neurochem 2005; 92(6): 1542-9.*
21. *Greene R, Siegel J. Sleep: a functional enigma. Neuromolecular Med 2004; 5(1): 59-68.*
22. *Stenberg D, Litonius E, Halldner L, Johansson B, et al. Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. J Sleep Res 2003; 12(4): 283-90.*
23. *Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk A, Alanko L, Urrila A, et al. Adenosine, energy metabolism, and sleep. ScientificWorldJournal 2003; 3: 790-8.*
24. *Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. Neuroscience 2000; 99(3): 507-17.*
25. *Mendelson WB. Effects of microinjections of triazolam into the ventrolateral preoptic area on sleep in the rat. Life Sci 1999; 65(25): L301-L307.*
26. *Mendelson WB. Sleep-inducing effects of adenosine microinjections into the medial preoptic area are blocked by flumazenil. Brain Res 2000; 852(2): 479-81.*
27. *Yakel JL, Warren RA, Reppert SM, North RA. Functional expression of adenosine A2b receptor in Xenopus oocytes. Mol Pharmacol 1993; 43(2): 277-80.*
28. *Thakkar MM, Delgiacco RA, Strecker RE, McCarley RW. Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats. Neuroscience 2003; 122(4):1107-13.*
29. *Meerlo P, Roman V, Farkas E, Keijser JN, et al. Ageing-related decline in adenosine A1 receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study. J Neurosci Res 2004; 78(5): 742-8.*
30. *Murillo-Rodriguez E, Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, et al. The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats. Neuroscience 2004; 123(2): 361-70.*
31. *Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, et al. Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. J Neurochem 2006; 98(2): 616-28.*
32. *Ferretti V, Pretto L, Tabrizi MA, Bertolasi V. A structural study of new potent and selective antagonists to the A2B adenosine receptor. Acta Crystallogr B 2005; 61(Pt 5): 569-76*
33. *Kuzmin A, Johansson B, Gimenez L, Ogren SO, et al. Combination of adenosine A1 and A2A receptor blocking agents induces caffeine-like locomotor stimulation in mice. Eur Neuropsychopharmacol 2006; 16(2): 129-36.*
34. *Schwierin B, Borbely AA, Tobler I. Effects of N6-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. Eur J Pharmacol 1996; 300(3): 163-71.*
35. *Landolt HP, Dijk DJ, Gaus SE, Borbely AA. Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. Neuropsychopharmacology 1995; 12(3): 229-38.*

36. *Landolt HP, Werth E, Borbely AA, Dijk DJ. Caffeine intake (200 mg) in the morning affects human sleep and EEG power spectra at night. Brain Res 1995; 675(1-2):67-74*
37. *Landolt HP, Retey JV, Tonz K, Gottselig JM, et al. Caffeine attenuates waking and sleep electroencephalographic markers of sleep homeostasis in humans. Neuropsychopharmacology 2004; 29(10): 1933-9.*
38. *Ammon HP. Biochemical mechanism of caffeine tolerance. Arch Pharm (Weinheim) 1991; 324(5): 261-7.*
39. *Chen MD, Lin WH, Song YM, Lin PY, et al. Effect of caffeine on the levels of brain serotonin and catecholamine in the genetically obese mice. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 1994; 53(5): 257-61.*
40. *Montano LM, Carbajal V, Arreola JL, Barajas-Lopez C, et al. Acetylcholine and tachykinins involvement in the caffeine-induced biphasic change in intracellular Ca2+ in bovine airway smooth muscle. Br J Pharmacol 2003; 139(6): 1203-11.*
41. *Wakade TD, Bhave AS, Bhave SV, Wakade AR. Activation of muscarinic and serotonergic receptors results in phosphoinositide hydrolysis but not in mobilization of calcium in sympathetic neurons. Blood Vessels 1991; 28(1-3): 6-10-*
42. *Salin-Pascual RJ, Valencia-Flores M, Campos RM, Castano A, et al. Caffeine challenge in insomniac patients after total sleep deprivation. Sleep Med 2006; 7(2):141-5.*
43. *Murillo-Rodriguez E, Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, et al. The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats. Neuroscience 2004; 123(2): 361-70.*
44. *Kamimori GH, Penetar DM, Headley DB, Thorne DR, et al. Effect of three caffeine doses on plasma catecholamines and alertness during prolonged wakefulness. Eur J Clin Pharmacol 2000; 56(8): 537-44.*
45. *Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, et al. Effects of caffeine and promazine hydrochloride on plasma catecholamines in thoroughbreds at rest and during treadmill exercise. Equine Vet J Suppl 1999; 30: 596-600.*
46. *Minana MD, Grisolia S. Caffeine ingestion by rats increases noradrenaline turnover and results in self-biting. J Neurochem 1986; 47(3): 728-32.*
47. *Boutrel B, Koob GF. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications. Sleep 2004; 27(6): 1181-94.*
48. *da Silva RS, Richetti SK, Silveira VG, Battastini AM, et al. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. Int J Dev Neurosci 2008; 26(3-4) 339-43.*
49. *Bennett HJ, Semba K. Immunohistochemical localization of caffeine-induced c-Fos protein expression in the rat brain. J Comp Neurol 1998; 401(1): 89-108.*
50. *Deurveilher S, Lo H, Murphy JA, Burns J, et al. Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. J Comp Neurol 2006; 498(5): 667-89.*
51. *Enslen M, Milon H, Wurzner HP. Brain catecholamines and sleep states in offspring of caffeine-treated rats. Experientia 1980; 36(9): 1105-6.*
52. *Nehlig A, Boyet S. Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. Brain Res 2000; 858(1): 71-7.*
53. *Perez V, Sosti V, Rubio A, Barbanoj M, et al. Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration. Eur J Pharmacol 2007; 576(1-3): 83-90.*
54. *Singewald N, Sharp T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. Neuroscience 2000; 98(4): 759-70.*
55. *Basheer R, Bauer A, Elmenhorst D, Ramesh V, et al. Sleep deprivation upregulates A1 adenosine receptors in the rat basal forebrain. Neuroreport 2007; 18(18): 1895-9.*
56. *Elmenhorst D, Meyer PT, Winz OH, Matusch A, et al. Sleep deprivation increases A1 adenosine receptor binding in the human brain: a positron emission tomography study. J Neurosci 2007; 27(9): 2410-15.*
57. *Salin-Pascual R, Gerashchenko D, Greco M, Blanco-Centurion C, et al. Hypothalamic regulation of sleep. Neuropsychopharmacology 2001; 25(5 Suppl): S21-S27.*
58. *Salin-Pascual RJ, Upadhyay U, Shiromani PJ. Effects of hypocaloric diet on sleep in young and old rats. Neurobiol Aging 2002; 23(5): 771-6.*

Correspondencia: Dr. Rafael J. Salín-Pascual
Departamento de Psicología Médica,
Psiquiatría y Salud Mental-Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Cerro del Agua s/n. Ciudad Universitaria
Correo electrónico: salin@servidor.unam.mx