
Comparación de dosis altas de las metilxantinas cafeína y teofilina en efectos motores y ansiogénicos: estudio en modelos animales

Laura López Cruz
lcruz@psb.uji.es
Marta Pardo
mpardo@guest.uji.es
Alicia Dosda
dosda@sq.uji.es
John D. Salamone
john.salamone@uconn.edu
Mercè Correa
correa@psb.uji.es

I. Resumen

1008



La cafeína y la teofilina son metilxantinas que actúan como antagonistas no selectivos de la adenosina, activando dos tipos de receptores adenosinérgicos presentes en el sistema nervioso central: los A_1 y los A_{2A} . Se ha demostrado que la cafeína a dosis altas produce efectos ansiogénicos y alteraciones motoras, sin embargo los efectos de la teofilina en estos parámetros no han sido tan estudiados. La teofilina, además de poder ser administrada de forma exógena, es un metabolito de la cafeína que también tiene efectos a nivel del SNC. El efecto de dosis altas de cafeína en interacción con etanol es un tema de interés reciente debido a las denominadas “bebidas energéticas”. En este sentido, el estudio de dosis altas de cafeína y de su metabolito teofilina en parámetros motores y de ansiedad, puede ser de ayuda para entender no sólo la implicación del sistema adenosinérgico en ellos, sino que también constituye la base para un futuro estudio sobre el impacto de la interacción entre estas metilxantinas y el alcohol. Además, ambas metilxantinas están siendo propuestas como sustancias terapéuticas para diferentes patologías relacionadas con la falta de dopamina. En este trabajo, se pretende estudiar los efectos de la administración aguda IP de dosis moderadas y altas de cafeína y teofilina (25, 50 ó 100 mg/kg) en medidas de locomoción (campo abierto, ruedas de actividad y rotarod) y ansiedad (laberinto elevado en cruz). La cafeína a dosis altas mostró tener efectos de supresión motora en diferentes paradigmas siendo más potente que la teofilina en conseguir este efecto. Aunque ambos tratamientos produjeron efectos ansiogénicos, la cafeína mostró ser más potente. Estos resultados demuestran que la cafeína a dosis altas podría producir efectos contrarios a los deseados tras su consumo, así como también permiten sugerir a la teofilina como un mejor agente terapéutico con menor riesgo de producir efectos no deseados en diferentes parámetros.

II. Introducción

De todas las sustancias psicoactivas la cafeína es la más ampliamente consumida (Antoniou et al., 2005; Ferré 2008; Reissig et al., 2009) estando presente en alimentos y bebidas como el café, el té, el cacao, el chocolate y algunos refrescos (Barone and Roberts, 1996). Entre los consumidores habituales se alcanza una ingesta en un rango que va 170-300 mg/día (Barone and Roberts, 1996). Este consumo produce un conjunto de efectos psicoestimulantes como reducción de la fatiga y aumento del rendimiento, con relativamente poco riesgo de efectos dañinos (Behlig et al., 1992; Fredholm et al., 1999). Sin embargo, a dosis altas (por encima de los 400-500 mg/día), los efectos de la cafeína varían entre individuos y pueden llevar a efectos indeseados, incluyendo un

aumento de la ansiedad, aumento de la presión arterial, dolor de cabeza y confusión (Fredholm et al., 1999).

La cafeína, una vez ingerida, es metabolizada principalmente por la enzima CYP1A2 presente en el hígado, constituye el 15% de enzimas citocromales P450 y es la responsable de un 90% del metabolismo de la cafeína (Shimada et al., 1994). La biotransformación de la cafeína por esta enzima resulta en diferentes metabolitos: paraxantina (81,5%), teobromina (10,8%) y teofilina (5,4%) (Gu et al., 1992). Estas dos últimas xantinas presentan una estructura química muy similar a la cafeína (Sagranow and Machoy, 2005). La teofilina, además de ser un producto del metabolismo de la cafeína, también puede ser ingerida como constituyente de bebidas como café, té, mate o guaraná (Weckerle et al., 2003). Ambas sustancias ejercen sus efectos psicoactivos, principalmente a través del antagonismo de los receptores de adenosina (Fredholm, 1999, 2001; von Lubitz et al., 1999). La adenosina es una purina que en el sistema nervioso central (SNC) actúa como neuromodulador a través de receptores de membrana. Los receptores de adenosina son del tipo purinérgico 1 y pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores se han clasificado en base a evidencias moleculares, bioquímicas y farmacológicas en cuatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Fredholm et al., 2001). Los receptores de adenosina A₁ y A₃ están acoplados negativamente a la adenilciclase por medio de las proteínas G_i ejerciendo influencias inhibitorias, mientras que los receptores A₂ están acoplados positivamente a esta enzima mediante las proteínas G_s, incrementando los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y ejerciendo así influencias excitatorias en las neuronas. Los niveles fisiológicos extracelulares de adenosina pueden ser suficientes para ocupar, y por tanto, estimular los receptores A₁ y A_{2A}, mientras que los receptores A_{2B} con una afinidad menor por la adenosina, solo son activados por niveles muy altos de adenosina (Fredholm et al., 2001). Los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} son probablemente los principales lugares de acción tanto de la teofilina como de la cafeína (von Lubitz, 1999; Fredholm et al., 1999, 2001).

Actualmente, hay un creciente interés en las acciones conductuales de las drogas que modulan la función del sistema adenosinérgico y de hecho, varios estudios se han centrado en la cafeína y otras metilxantinas como la teofilina como herramientas para su estudio (Daly et al., 2007; Fredholm et al., 2001). Gran parte de este interés surge de la localización de los receptores de adenosina a nivel cerebral, de su colocalización con otros sistemas de neurotransmisión y de su consecuente relevancia como posible diana terapéutica para algunos trastornos. En este sentido, antagonistas de A_{2A} han demostrado tener efectos antiparkinsonianos (Correa et al., 2004; Jenner, 2005; Pinna, 2010; Salamone, 2010). Así como también antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina A₁/A_{2A} como la cafeína y la teofilina a dosis moderadas y altas (10-50 mg/kg) han demostrado revertir los efectos parkinsonianos inducidos por

antagonistas de los receptores D₂ (Bishnoi et al., 2007; Trevitt et al., 2009). En humanos, estudios epidemiológicos han encontrado una fuerte relación inversa entre el consumo de café y la prevalencia de la enfermedad del parkinson (Gale and Martyn, 2003).

Otra parte del interés por las metilxantinas es su consumo en interacción con bebidas alcohólicas. El consumo de bebidas alcohólicas junto a bebidas energéticas con un alto contenido en cafeína se ha convertido en una práctica común en jóvenes (O'Brien et al., 2008). Esta combinación produce una disminución en la percepción subjetiva de intoxicación (Ferreira et al., 2006; Marczyński and Fillmore, 2006) que no parece ir acompañada por alteraciones en parámetros objetivos como la concentración de alcohol en aire espirado (Ferreira et al., 2004), pero que podría estar a la base de conductas de riesgo como conducir bajo los efectos del alcohol (O'Brien, 2008).

a) Efecto de la cafeína y la teofilina en la regulación motora

Las metilxantinas pueden incrementar la actividad motora con una respuesta de dosis en U invertida, es decir, ejercen efectos estimulantes en la locomoción a dosis bajas-moderadas, pero a dosis altas no muestran efectos estimulantes e incluso llegan a producir efectos supresores (Kuribara et al., 1992; Nehlig et al., 1992; Svenningsson et al., 1995; El Yacoubi et al., 2000; Malec and Poleszak, 2006; Randall et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Los datos provenientes de estudios con teofilina demuestran que esta metilxantina tiene efectos estimulantes en diferentes estirpes de ratones a dosis que van desde 3 a 100 mg/kg (Hirose et al., 2004; Malec and Poleszak, 2006; Pardo et al., 2010; Zhang et al., 2011). En el estudio de Zhang et al., (2011) en el cual se utiliza la vía IP en ambas sustancias, se evidencia que la cafeína es más potente pero muestra igual eficacia que la teofilina en los incrementos en locomoción. Cuando la administración es oral, la cafeína resulta más potente y más eficaz que la teofilina en este efecto (Kuribara, 1992). Otros estudios también observan diferencias en cuanto a la potencia de ambas metilxantinas en modular la respuesta instrumental en ratas (Randall et al., 2011; Carney et al., 1984).

Los efectos de la cafeína en la locomoción también han sido explorados en paradigmas que evalúan la coordinación motora. En este sentido, se ha observado que dosis crecientes de cafeína (30, 60 y 120 mg/kg) incrementan la frecuencia de tropiezo en el paradigma de *Holeboard* en ratones sugiriendo efectos incoordinantes motores con dosis altas de cafeína (Meyer and Caston, 2005). Sin embargo, escasean los estudios sobre el efecto de diferentes metilxantinas en la coordinación motora con otros paradigmas. En los dos únicos estudios que utilizan un rotarod se observa que una dosis de 50 mg/kg de teofilina en ratas no altera la ejecución (Clark and Dar, 1988) y la misma falta de efecto se

obtiene con una dosis baja de cafeína (5 mg/kg) en ratones (Ghelardini et al, 1997).

b) Efectos de la cafeína y teofilina en ansiedad

La adenosina así como agonistas exógenos de los receptores de adenosina han demostrado ejercer ansiólisis en modelos animales de ansiedad (Kulkarni et al., 2007; Okuyama et al., 1999). Por el contrario, antagonistas adenosinérgicos como la cafeína y la teofilina han demostrado tener efectos ansiogénicos tanto en humanos como en roedores (Correa and Font, 2008). En este sentido, la cafeína ha demostrado ser ansiogénica tanto en sujetos normales (Greden 1974; Uhde et al., 1984; Bruce, 1990) como en aquellos con trastorno depresivo o de ansiedad (Nickel and Uhde, 1994) y al igual que la teofilina, puede inducir ataques de pánico en pacientes con susceptibilidad a esta patología (Boulenger et al., 1984). También han demostrado efectos ansiogénicos en diferentes modelos animales de ansiedad. Por ejemplo, en el laberinto elevado en cruz y en el test de interacción social, la cafeína a dosis a dosis de 20-40 mg/kg ha demostrado tener efectos ansiogénicos en ratas Hooded (Baldwin et al., 1989). En ratones, se ha observado que dosis de 30 mg/kg han mostrado efectos ansiogénicos (Prediger et al., 2004; Nisha et al., 1995) y también dosis de 25, 50 y 100 mg/kg en el laberinto elevado en cruz en ratones (El Yacoubi et al., 2000). Efectos similares se han obtenido a dosis moderadas-altas (15, 30 y 60 mg/kg) en el elevated zero maze (Kulkarni, 2007). La cafeína también ha demostrado producir efectos ansiogénicos en la caja luz-oscuridad, aunque en este último paradigma los resultados son menos claros (Costall et al., 1989; El Yacoubi et al, 2000). Costall et al. (1989) no observaron diferencias en la conducta exploratoria entre el compartimento oscuro y el luminoso en la caja luz-oscuridad tras la administración de cafeína (15, 30 y 45 mg/kg) como indicadores de ausencia de conducta ansiogénica en ratones. Sin embargo, El Yacoubi et al. (2000) por su parte sí que observa una disminución en el número de entradas en el compartimento luminoso tras la administración de dosis de 50 y 100 mg/kg de cafeína, sin embargo produjeron un decremento en el número total de cruces como índice de alteración motora. Los efectos ansiogénicos de la teofilina también han sido estudiados y se ha observado que la teofilina a dosis altas de 60 mg/kg (y no a dosis de 30 mg/kg, al contrario que la cafeína) presenta efectos ansiogénicos en el *elevated O maze* y en el laberinto elevado en cruz. Vemos pues, que ambas metilxantinas han demostrado ejercer efectos ansiogénicos, sin embargo, los estudios sobre los efectos de la teofilina en parámetros de ansiedad son más bien escasos.

Aunque hasta el momento se ha propuesto que la cafeína es más potente que la teofilina en parámetros conductuales (Carney 1984; Kuribara et al., 1992; Randall et al., 2011), son pocos los trabajos que se han centrado en realizar estudios comparativos sistemáticos de ambas sustancias en parámetros conductuales y neuroendocrinos en los que ha

mostrado estar involucrado el sistema adenosinérgico. Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo comparar el efecto de dosis altas de cafeína y teofilina en parámetros motores que generan niveles muy diferentes de locomoción (el campo abierto y la rueda de actividad), así como en paradigmas que registran la coordinación motora (el rotarod) y la ansiedad (el laberinto elevado en cruz y la caja luz-oscuridad).

III. Materiales y métodos

a) Sujetos y condiciones de estabulación

Se utilizaron ratones CD1 (30-45 g) procedentes Harlan-Interfauna Iberica S.A. (Barcelona, Spain). Los ratones, de 9-10 semanas de edad, fueron estabulados en cajas de tres con comida de laboratorio estándar y agua disponible *ad libitum*. La temperatura en la colonia se mantuvo a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con el periodo de luz de 8:00 a 20:00 horas. Todos los procedimientos experimentales cumplían con la European Community Council directive (86/609/ECC) para el uso de animales de laboratorio y con el "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research" (National Research Council 2003).

b) Drogas

Todas las drogas se administraron de forma aguda e intraperitonealmente (IP). Las drogas utilizadas, Cafeína y Teofilina (Sigma-Aldrich, España) son antagonistas no selectivos de la adenosina y fueron disueltas en 0.9% w/v salina. Como vehículo se utilizó solución salina.

c) Aparatos y procedimientos experimentales

- **Locomoción en campo abierto (CA).** La actividad locomotora se evaluó durante 10 minutos en un CA (Holland & Weldon, 1968). Este paradigma consiste en un cilindro de plexiglás transparente de 25 x 30 cm dividido en su base en 4 cuadrantes de iguales dimensiones. Se registró de forma manual el número de cruces horizontales como índice de los niveles de locomoción espontánea. Cada cruce se registraba cada vez que el animal cruzaba a otro cuadrante con sus cuatro extremidades. Los animales fueron manipulados dos días previos al test, pero sin preexposición previa al campo abierto.
- **Actividad locomotora en rueda de actividad (RA).** Las RA (Hugo Basile, Italia) consiste en una rueda metálica (25 cm de diámetro) situada en la parte lateral de una caja de pexiglás (35X20 cm). Dicha rueda está conectada a un contador automático que registra las vueltas completas de la rueda. Se consideró el número de cuentas totales en la RA durante 30 minutos como índice de actividad locomotora. De forma previa al test, los animales fueron entrenados a



la RA y habituados a la inyección salina. Cuando los animales son habituados las RA se observan altos niveles de conducta locomotora haciendo más fácil la observación de los efectos supresores de ciertas drogas.

- **Rotarod.** La coordinación motora y el equilibrio se evaluaron en el rotarod (UGO Basile, 7650, Jones & Roberts). Este aparato consiste en una rueda rotatoria que requiere de movimientos coordinados para evitar caer de ella. Está constituida por cinco compartimentos de 6 cm que dividen una plataforma circular rotatoria elevada. Cada animal se situó en la rueda rotatoria que giraba a una velocidad ascendente de 1 a 10 rpm en incrementos de 1 rpm cada 30 segundos, tarea que requiere la ejecución de movimientos coordinados para evitar caer. Los animales fueron evaluados durante 10 ensayos, pero solo los 5 últimos ensayos se consideraron para los estadísticos. Se estableció un punto de corte de 390 segundos por ensayo y se registró el tiempo en el que el animal tardaba en caer de la rueda como índice de incoordinación motora. Los animales fueron manipulados un día previo al test.
- **Test de ansiedad en Laberinto Elevado en Cruz.** Este test utiliza la aversión innata que los roedores muestran por las áreas elevadas y desprotegidas (Kliethermes, 2007; Nadal et al., 2005). El aparato consiste en dos corredores (65cm de largo x 5cm de ancho) que se cruzan en el centro y que se encuentran elevados en relación al suelo (50 cm). Uno de los corredores tiene paredes elevadas (brazo cerrado) y el otro corredor sólo dispone de un pequeño borde que evita que el animal se caiga (brazo abierto). Se requiere que los animales nunca antes hayan sido expuestos al laberinto porque rápidamente se genera habituación y ello reduce la tendencia espontánea del animal a explorar un ambiente nuevo. Se consideró el número de entradas en los brazos abiertos respecto al total de cruces totales a todos los brazos (ratio de entradas a brazo abierto), el tiempo de permanencia de los animales en los brazos descubiertos y la latencia en salir al brazo abierto por primera vez en un periodo de 5 minutos como índices de conducta ansiogénica. Los animales fueron manipulados y habituados a la inyección salina un día previo al test.

IV. Experimentos

1014

UNIVERSITAT
JAUME I

SECCIÓN 1: Efectos de los antagonistas no selectivos de la adenosina, cafeína y teofilina, en parámetros motores.

Diferentes grupos de animales fueron asignados a los diferentes experimentos motores.

Experimento 1.1. Efecto de la cafeína y de la teofilina en la actividad motora en el campo abierto. Los ratones (N= 69) recibieron inyección salina como vehículo, cafeína o teofilina (25, 50 ó 100 mg/kg) 30 min previos al test.

Experimento 1.2. Efecto de la cafeína y teofilina en la actividad motora en la rueda de actividad. Los ratones (N=83) recibieron inyección salina como vehículo, cafeína o teofilina (25, 50 ó 100 mg/kg) 30 min previos al test

Experimento 1.3. Efecto de la cafeína y de la teofilina en la incoordinación motora en el rotarod. Los ratones (N=55) recibieron inyección salina como vehículo, cafeína o teofilina (25, 50 ó 100 mg/kg) 30 min previos al test.

SECCIÓN 2: Efectos de los antagonistas no selectivos de la adenosina en parámetros de ansiedad.

La dosis más alta de cafeína y teofilina (100 mg/kg) no fue utilizada en este bloque debido a sus efectos de alteración motora.

Experimento 2.1. Efecto de la cafeína y teofilina parámetros de ansiedad en el laberinto elevado en cruz. Los ratones (N=66) recibieron inyección salina como vehículo, cafeína o teofilina (25 ó 50 mg/kg) 30 min previos al test.

a) Estadísticos

Los experimentos siguieron un diseño entre-grupos. Los datos que siguieron una distribución normal fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y una prueba *post hoc* Newman-Keuls para realizar las comparaciones múltiples entre grupos. Por su parte, los datos que no se ajustaron a una distribución normal se analizaron mediante un ANOVA de un factor Kruskal-Wallis para estudiar el efecto del factor tratamiento sobre medidas de latencia y se hizo uso de la prueba U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre grupos.

Se estableció un nivel de significación de 0.05 o menor. Los estadísticos se realizaron mediante el software STATISTICA 7.

V. Resultados

1015

SECCIÓN 1 Efectos de los antagonistas no selectivos de la adenosina, cafeína y teofilina, en parámetros motores.

Experimento 1.1. Efecto de la cafeína y de la teofilina en la actividad motora en el campo abierto.

El ANOVA de un factor mostró efectos significativos del factor tratamiento sobre la locomoción horizontal [F(6, 62)= 678,63, $p < 0.01$]. La prueba *post hoc* Newman-Keuls reveló un efecto estimulante de la teofilina (50mg/kg) respecto al grupo control, $p < 0,01$.

Ninguna dosis de cafeína mostró ser significativamente diferente del grupo control. La cafeína y la teofilina mostraron diferencias significativas entre ambas tras la administración de las dosis más altas 50 y 100 mg/kg ($p < 0,01$).

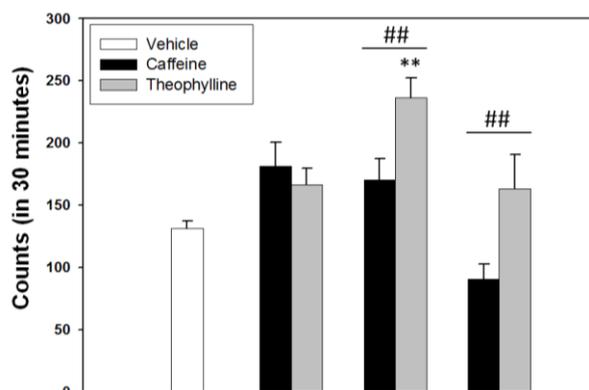


Fig. 1. Efecto de la cafeína y la teofilina IP en la locomoción horizontal en campo abierto. Media \pm SEM número de cuentas durante 10 minutos. * $p < 0.01$ significativamente diferente respecto al grupo control. ## $p < 0.01$ diferencias significativas entre tratamientos a la misma dosis.

Experimento 1.2. Efecto de la cafeína y teofilina en la actividad motora en la rueda de actividad.

El ANOVA reveló un efecto significativo del tratamiento en la actividad locomotora en la rueda de actividad [F(6,76)= 267,85, $p < 0,01$]. El test Newman-Keuls reveló que la administración aguda todas las dosis de cafeína (25, 50 and 100 mg/kg) produjeron un efecto supresor en la locomoción ($p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente) en comparación con el grupo control. La teofilina produjo una suppression motora significativa a dosis de 50 y 100 mg/kg ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente). Además, la cafeína a dosis de 25 mg/kg no solo mostraron un efecto supresor en comparación con el grupo control sino también en comparación con la teofilina a esta misma dosis ($p < 0,01$). Estos resultados sugieren que la cafeína parece ser más potente que la teofilina en los efectos supresores motores en la rueda de actividad (Fig. 2).

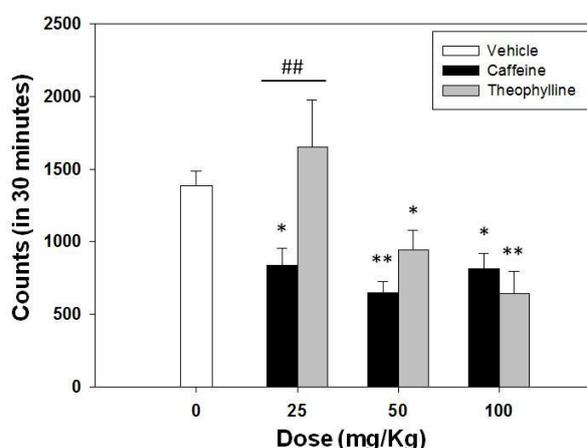


Fig 2. Efecto de la cafeína y la teofilina IP en la locomoción en la rueda de actividad. Media \pm SEM de cuentas durante 30 minutos. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ diferencias significativas respecto al grupo control. ## $p < 0.01$. diferencias significativas entre tratamientos a la misma dosis.

Experimento 1.3. Efecto de la cafeína y de la teofilina en la incoordinación motora en el rotarod.

El ANOVA de un factor reveló que hay un efecto del tratamiento en el nivel de ejecución en el rotarod [F(6,48)= 380,17, p<0,01]. El test Newman-Keuls mostró que la administración aguda de dosis altas de cafeína (50 y 100 mg/kg) redujo el tiempo de permanencia en el rotarod, mientras que solo la dosis más alta de teofilina (100 mg/kg) disminuyó este parámetro (p<0,01). Estos resultados sugieren un mayor efecto supresor de la cafeína respecto a la teofilina en la ejecución motora en este paradigma (Fig. 3).

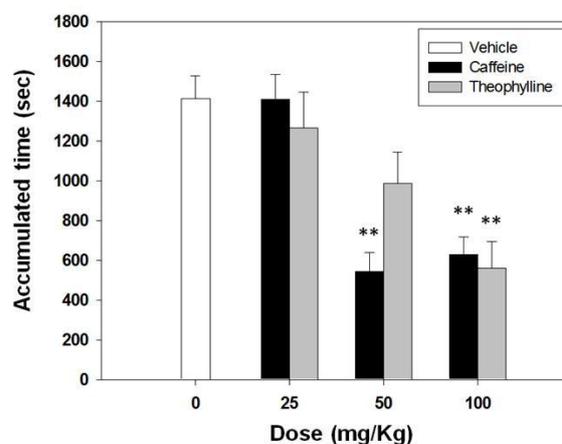


Fig 3. Efecto de la cafeína y la teofilina IP en el rotarod. Media ±SEM de segundos acumulados en el rotarod durante 5 ensayos. **p<0.01 diferencias significativas respecto a vehículo.

SECCIÓN 2: Efectos de los antagonistas no selectivos de la adenosina en parámetros de ansiedad.

En el siguiente experimento solo se utilizaron las dos dosis menores (25 y 50 mg/kg) de cafeína y teofilina con la finalidad de minimizar los efectos supresores motores e incoordinantes observados en la sección 1.

Experimento 2.1. Efecto de la cafeína y teofilina sobre parámetros de ansiedad en el laberinto elevado en cruz.

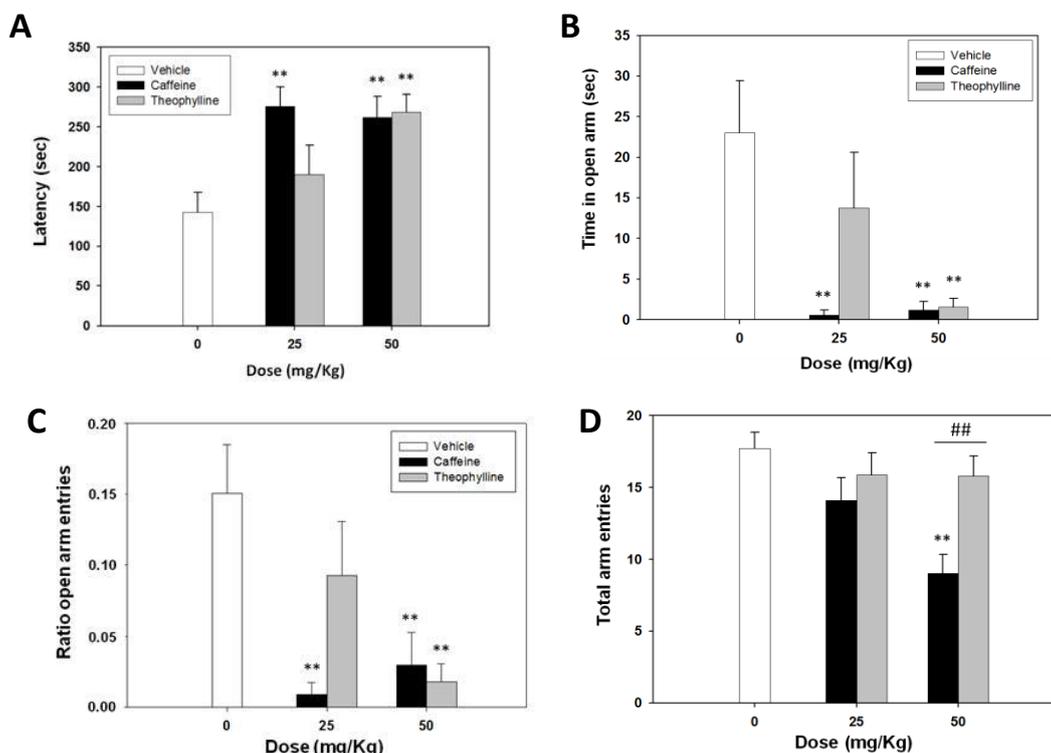


Fig 5. Efecto de la cafeína y teofilina IP en el laberinto elevado en cruz. Media \pm SEM de A) la latencia en entrar en brazo abierto B) tiempo (seg) en brazo abierto, C) ratio de entradas en brazo abierto y D) entradas totales durante 5 minutos. (## $p < 0.01$ diferencias significativas entre tratamientos a la misma dosis ** $p < 0.01$ diferencias significativas en rangos entre tratamientos en A o ** $p < 0.01$ diferencias significativas respecto a vehículo en B, C and D).

El test no paramétrico Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo del factor tratamiento sobre la latencia en entrar al brazo abierto (4 df)= 20,64, $p < 0,01$]. El test U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre todas las dosis de cafeína (25 mg/kg y 50 mg/kg) y el grupo control [U=26,5, $p < 0,01$; U=33, $p < 0,01$, respectivamente] mostrando un incremento significativo en la latencia en entrar al brazo abierto con estas dosis de cafeína. Sin embargo, solo la dosis más alta de teofilina (50 mg/kg) mostró este efecto significativo en la latencia con respecto al grupo control [U=31, $p < 0,01$] (fig 5. A).

Para el resto de variables, la ANOVA de un factor reveló un efecto significativo del tratamiento en el tiempo en brazo abierto [F(4,61)=17,70; $p < 0.01$] y ratio de entradas en brazo abierto [F(4,61)= 23,07; $p < 0,01$]. Las comparaciones *post hoc* mostraron que todas las dosis de cafeína (25 and 50 mg/kg) y la dosis más alta de teofilina (50 mg/kg) redujo de forma significativa el tiempo de permanencia en el brazo abierto y el ratio de entradas a brazo abierto (Newman-Keuls test, $p < 0,01$), indicando de nuevo un efecto ansiogénico más potente de la cafeína en comparación con la teofilina (Fig 5.B-C).

Finalmente, el ANOVA de un factor mostró que el número de entradas totales se vio afectado de forma significativa por el factor tratamiento [F(4,61)= 532,08; $p < 0,01$]. La cafeína redujo el número de entradas totales con la dosis más alta (50 mg/kg) en comparación con el grupo control ($p < 0,01$) y en comparación con la teofilina a la misma dosis ($p < 0,01$). De forma consistente con los resultados observados en la sección 1, este resultado indica un efecto supresor de la cafeína a dosis altas en la actividad locomotora (Fig 5.D).

VI. Discusión

Este trabajo ofrece un estudio comparativo entre la cafeína y la teofilina a dosis moderadas-altas en diferentes parámetros conductuales; locomoción y ansiedad.

La evaluación de los efectos estimulantes de las drogas en el SNC suele llevarse a cabo mediante el análisis de la actividad locomotora de los animales en un CA (Himmel, 2008; Han et al., 2009). En este estudio, en psicoestimulante menor cafeína, muestra una respuesta de U invertida en la locomoción. Sin embargo, este efecto no alcanza una significación estadística, ni para los efectos estimulantes ni para los efectos supresores. Datos previos han mostrado incrementos significativos en la distancia recorrida en CA a dosis que varían de 1-30 mg/kg (El Yacoubi et al., 2000; Sanchis-Segura et al., 2000; Font et al., 2005; Zhang et al., 2011)

y decrementos significativos a dosis altas (100 mg/kg) (El Yacoubi et al. 2000; Zhang et al., 2011). Estos datos podrían sugerir que podrían precisarse de dosis más bajas de cafeína que las utilizadas en nuestros experimentos para inducir efectos estimulantes. Además, aunque a dosis bajas (15 y 25 mg/kg) la cafeína induce actividad locomotora tanto en animales habituados como en no habituados (El Yacoubi et al. 2000; Pastor et al., 2005), reduciendo la actividad basal en el CA mediante la habituación de los animales al paradigma permite a las dosis altas (50 mg/kg) de cafeína inducir locomoción (El Yacoubi et al. 2000). La teofilina produjo un efecto estimulante a dosis de 50 mg/kg y un efecto no supresor con la dosis más alta. Sin embargo, el propósito del siguiente grupo de estudios era comparar directamente los efectos de la cafeína y de la teofilina. De hecho, los grupos tratados con cafeína y los tratados con teofilina a dosis altas (50 y 100 mg/kg) fueron significativamente diferentes uno respecto al otro, indicando que la teofilina tiene un efecto más potente en cuanto a la inducción locomotora y menos potente a la hora de inducir supresión motora. Datos previos muestran que la teofilina, en un amplio rango de dosis (incluyendo las utilizadas en este estudio) (3-100 mg/kg) incrementa la actividad motora en CA (Malec and Poleszak, 2006; Pardo et al., 2010; Zhang et al. 2011).

Otro paradigma para la evaluación de la actividad locomotora es la RA (Harri et al., 1999; de Visser et al., 2005) y de hecho, es útil para la evaluación de posibles efectos supresores de algunas sustancias. En este trabajo, la cafeína mostró un efecto supresor sobre la locomoción en la rueda de actividad a todas las dosis, mientras que la teofilina solo mostró este efecto a las dosis más altas (50 y 100 mg/kg). Estos resultados sugieren que la cafeína es más potente que la teofilina en su efecto supresor en la RA. Además, este paradigma parece ser más sensible a los efectos supresores de dosis altas de metilxantinas en la locomoción. Por otra parte, la coordinación motora y el equilibrio se evaluaron mediante el rotarod. De nuevo se observó un efecto supresor de la cafeína tras la administración de las dos dosis más altas (50 y 100 mg/kg) mientras que la teofilina solo mostró este efecto a la dosis más alta (100 mg/kg). Estos resultados están en consonancia con un estudio que evalúa la frecuencia de tropiezo tras la administración de cafeína (30-120 mg/kg) como medida de coordinación motora en un *holeboard*. Tomando en conjunto todos estos resultados, demostramos que la cafeína es más potente que la teofilina en producir efectos supresores e incoordinantes de la locomoción.

Finalmente, confirmamos que la cafeína es un agente ansiogénico tras su administración a altas dosis en el laberinto elevado en cruz. Dosis moderadas (25 mg/kg) y altas (50 mg/kg) de cafeína incrementaron la latencia en entrar al brazo abierto, disminuyeron el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y el ratio de entradas en brazo abierto, produciendo una preferencia por las zonas protegidas del laberinto como índice de efecto ansiogénico. Estos resultados están en

consonancia con investigaciones previas realizadas en ratas y en ratones utilizando rangos de dosis similares (El Yacoubi et al. 2000; Kulkarni et al. 2007; Baldwin et al., 1989). La teofilina en el laberinto elevado en cruz solo mostró efectos ansiogénicos en la dosis más alta (50 mg/kg). Este efecto es similar al observado en el estudio de Kulkarni y colaboradores (2007) en el que la dosis de 30 mg/kg no fue efectiva pero la de 60 mg/kg produjo efectos ansiogénicos en el laberinto elevado en cruz. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las mismas dosis de cafeína y la teofilina en las medidas de ansiedad. La única diferencia significativa se observó en el número total de entradas que fue afectado por la dosis más alta de cafeína, un resultado que podría ser debido al efecto de supresión motora de la cafeína a dosis altas, mientras que la teofilina no afectó a este parámetro. Estos resultados sugieren que la cafeína parece tener mayor potencia a la hora de producir efectos ansiogénicos en este paradigma y muestra de nuevo un efecto sobre la locomoción.

Este estudio ofrece una necesaria comparación entre la cafeína y la teofilina en diferentes parámetros conductuales que pueden ser afectados por la administración de estas sustancias; locomoción y ansiedad. Además, estos resultados pueden ayudar a un mayor entendimiento de los efectos potenciales de estos antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina, cafeína y teofilina, que están siendo consumidos en forma de café, comida o refrescos (Barone and Roberts, 1996) y están siendo propuestas como posibles agentes terapéuticos (Morelli and Pinna, 2002; Correa et al., 2004; Simola et al., 2004; Salamone et al., 2008). De hecho, aunque la cafeína está siendo generalmente consumida con el propósito de incrementar el estado de alerta, reducir la fatiga, o mejorar la ejecución, nuestros resultados sugieren que, a dosis altas podrían inducir los efectos opuestos a los deseados. Además, la separación entre eficacia terapéutica y efectos secundarios adversos sigue siendo un reto en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos adenosinérgicos y el siguiente estudio puede ayudar a establecer el rango de dosis que puede inducir a efectos secundarios indeseados en la locomoción y en ansiedad. Debido a que la teofilina a dosis alta ha demostrado tener efectos menos potentes a la hora de inducir supresión motora y efectos ansiogénicos, sugerimos que esta metilxantina podría ser un mejor agente terapéutico que la cafeína.

VII. Bibliografía

Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Papathanasiou G, Bekris E, Marselos M, Panlilio L, Müller CE, Goldberg SR, Ferré S (2005) A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Psychopharmacology* 183(2):154–162

Arnaud (1976) Identification, kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1-Me-¹⁴C]caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochemical Medicine* [16\(1\)](#): 67-76

Baldwin HA, File SE (1989) Caffeine-induced anxiogenesis: the role of adenosine, benzodiazepine and noradrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 32:181-186

Barone JJ and Roberts HR (1996) Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol* 34:119-129

Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK (2007) Theophylline, adenosine receptor antagonist prevents behavioral, biochemical and neurochemical changes associated with an animal model of tardive dyskinesia. *Pharmacol Rep* 59:181-191

Blumstein LK, Crawley JN (1983) Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 18:37-40

Bruce MS (1990) The anxiogenic effects of caffeine. *Postgrad Med J* 66 Suppl 2:18-24.

Carney JM (1984) Effect of caffeine, theophylline and theobromine on schedule controlled responding in rats. *Br. J. Pharmacol* 75:451-454

Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG, Aloyo VJ, Fink, JS, Schwarzschild MA (2000) Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience* 97: 195-204

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, [Sonsalla PK](#), [Castagnoli K](#), [Castagnoli N Jr](#), [Schwarzschild MA](#) (2001) Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:RC143

[Clark M](#), [Dar MS](#) (1988) Mediation of acute ethanol-induced motor disturbances by cerebellar adenosine in rats. [Pharmacol Biochem Behav](#) 30(1):155-61

[Correa M](#), [Wisniecki A](#), [Betz A](#), [Dobson DR](#), [O'Neill MF](#), [O'Neill MJ](#) and [Salamone, JD](#) (2004) The adenosine A2A antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and tremulous jaw movements induced by haloperidol in rats: possible relevance to parkinsonism. *Behav Brain Res* 148: 47-54.

Correa M; Font L. (2008) Is there a major role of A2A adenosine receptor in anxiety? *Front Biosci* 13:4058-4070

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM (1989) Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32:777–785

Daly JW, Shi, D, Nikodijevic O, Jacobson, KA (1999) The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. In: Gupta BS, Gupta, U., (eds) *Caffeine and behavior-current views and research trends*. CRC Press, Boca Raton 28(19): 1-16

de Visser L, van den Bos R, Spruijt BM (2005) Automated home cage observations as a tool to measure the effects of wheel running on cage floor locomotion. *Behav Brain Res* 160:382–388

El Yacoubi M, Ledent C, M Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM (2003) Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology* 45:977–985

El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J.M., (2003) Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology* 45, 977– 985

[Elmazar MM](#), [McElhatton PR](#), [Sullivan FM](#) (1981) Acute studies to investigate the mechanism of action of caffeine as a teratogen in mice. [Hum Toxicol](#) 1(1):53-63

Fastbom J, Pazos A, Palacios JM (1987) The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* 22:813–826

Ferré S, Ciruela F, Borycz J, Solinas M, Quarta D, Antoniou K, Quiroz C, Justinova Z, Lluís C, Franco R, Goldberg SR (2008) Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front Biosci* 13:2391–2399

Ferreira SE, de Mello MT, Rossi MV, Souza-Formigoni ML (2004) Dose an energy drink modify the effects of alcohol on maximal effort test? *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1408-1412

Ferreira SE, Quadros IM, A' gatha AT, Takahashi SS, Koyama RG,. Souza-Formigoni MO (2004) Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice. *Physiol Behav* 82: 841–847

Font L, Miquel M, Aragon CM (2005) [Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: a sequestration agent for acetaldehyde](#). *Alcohol Clin Exp Res* 29(7):1156-1164

Fredholm BB, [Chen](#) FJ, [Cunha](#) RA, [Svenningsson](#) P, [Vaugeois](#) JM (2005) Adenosine and Brain Function. [International Review of Neurobiology](#) 63: 191-270



Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51: 83 - 133

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN & Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527–552.

Fuxe K, Ferré S, Zoli M, Agnati LF (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A_{2A}/ dopamine D₂ and adenosine A₁/ dopamine D₁ receptor interactions in the basal ganglia. [Brain Res Brain Res Rev 26 \(2-3\)](#): 258-273

Gale C, Martyn C (2003) Tobacco, coffee, and Parkinson's disease. *BMJ* 326:561–562

Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. (1997) Caffeine induces central cholinergic analgesia. [Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.](#) 356(5):590-595

Greden JF(1974) Anxiety or caffeinism: a diagnostic dilemma. *Am J Psychiatry* 131: 1089-1092

Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, Tang BK (1992) Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, theophylline by cDNA-expressed human CYP2A1 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2(2):73-77

Harri M, Lindblom J, Malinen H, Hyttinen M, Lapvetelainen T, Eskola S, [Helminen HJ](#) (1999) Effect of access to a running wheel on behavior of C57BL/6J mice. *Lab Anim Sci* 49:401–405

Himmel HM (2008) Safety pharmacology assessment of central nervous system function in juvenile and adult rats: effects of pharmacological reference compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58:129–146

Hirose M, Yokoyama H, Iinuma K (2004) Theophylline impairs memory/learning in developing mice. *Brain Dev* 26: 448–452

Holland HC, Weldon E (1968) [A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation.](#) *Acta Psychol (Amst)* 28(3):293-300

Jenner P (2005). Istradefylline, a novel adenosine A_{2A} receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig Drugs* 14:729-738

Jones BJ and Roberts (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Oharmacol.* 20 (4): 302-304



Kliethermes CL (2007) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28(8):837–850

Kulkarni SK, Singh K and Bishnoi M (2007) Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours. *Indian J Exp Biol* 45:439-443

Kuribara H, Asahi T, Tadokoro S (1992) Behavioral evaluation of psychopharmacological and psychotoxic actions of methylxanthines by ambulatory activity and discrete avoidance in mice. *J Toxicol Sci* 17:81–90

Lachance MP, Marlowe C, Waddel WJ (1983) Autoradiographic disposition of [1-methyl-¹⁴C]- and [2-¹⁴C]caffeine in mice. [Toxicology and Applied Pharmacology](#) 71(2): 237-241

Liguori A, Robinson JH (2001) Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. *Drug Alcohol Depend* 63:123-129

Lin AS, Uhde TW, Slate SO, McCann UD (1997) Effects of intravenous caffeine administered to healthy males during sleep. *Depress Anxiety* 5: 21–28

Malec D, Poleszak E. (2006) Involvement of adenosine receptors in dizocilpine-induced motor activity in mice. *Pharmacol Rep* 58:101-106

Marczinski CA, Fillmore MT (2006) Clubgoers and their trendy cocktails: implications of mixing caffeine into alcohol on information processing and subjective reports of intoxication. *Exp Clin Psychopharmacol* 14:450-458

Meyer L and Caston J (2005) Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57Bl6/J male mice. *Brain Res* 1039:171– 176

Morelli M, Pinna A (2001) Interaction between dopamine and adenosine A2A receptors as a basis for the treatment of Parkinson's disease. *Neurol Sci* 22:71–72

Nadal R, Rotllant D, Márquez C, Armario A (2005) Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 165(1):72–79

Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17:139-170

Nickell PV and Uhde TW (1994) Dose-response effects of intravenous caffeine in normal volunteers. *Anxiety* 1:161-168

O'Brien MC, McCoy PT, Rhodes SD, Wagoner A, Wolfson et al (2008) Caffeinated Cocktails: Energy Drink Consumption, High-risk Drinking, and Alcohol-related Consequences among college Students. *Society for Academic Emergenci Medicine* 15(5):453-60

Okuyama E, Ebihara H, Takeuchi H, Yamazaki M (1999) Adenosine, the anxiolytic-like principle of the Arillus of *Euphoria longana*. *Plant Med* 65:(2) 115-119

Pardo M, Lopez-Cruz L, Hockemeyer J, Müller CE, Salamone, J.D, Correa M (2010). Interaction between Dopamine D2 receptor and adenosine A1 and A2A receptors: Studies of c-Fos immunoreactivity, behavioral activation and effort related decision making. *Society for Neuroscience Abstracts*. 916.19/NNN17

[Pastor R](#), [McKinnon CS](#), [Scibelli AC](#), [Burkhart-Kasch S](#), [Reed C](#), [Ryabinin AE](#), [Coste SC](#), [Stenzel-Poore MP](#), [Phillips TJ](#) (2008) Corticotropin-releasing factor-1 receptor involvement in behavioral neuroadaptation to ethanol: a urocortin1-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(26):9070-9075

Pastor R, Miquel M, Aragon CM (2005) [Habituation to test procedure modulates the involvement of dopamine D2- but not D1-receptors in ethanol-induced locomotor stimulation in mice](#). *Psychopharmacology* 182(3):436-46

Pinna A (2010) Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18: 1619-1631

[Prediger RD](#), [Batista LC](#), [Takahashi RN](#) (2004). Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *Eur J Pharmacol*. 499:147-154

Randall PA, Nunes EJ, Jannièrè SL, Stopper CM, Andrew M. Farrar AM Sager TN, Baqi Y, Hockemeyer J, Müller CE, Salamone JD (2011) Stimulant effects of adenosine antagonists on operant behavior: differential actions of selective A2A and A1 antagonist. *Psychopharmacology*. DOI 10.1007/s00213-011-2198-3

Reissig CJ, Strain EC, Griffiths RR (2009) Caffeinated energy drinks —a growing problem. *Drug Alcohol Depend* 99:1–10

Safranow K and Machoy (2005) Methylated Purines in Urinary Stones. *Clin Chem* 51(8):1493-8.

Salamone JD, Betz AJ, Ishiwari K, Felsted J, Madson L, Mirante B, Clark K, Font L, Korbey S, Sager TN, Hockemeyer J and Muller CE (2008) Tremorolytic effects of adenosine A2A antagonists: implications for parkinsonism. *Front Biosci* 13: 3594-3605

Sanchis-Segura C, Correa M, Aragon CM (2000) [Lesion on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion](#). *Behav Brain Res* 114(1-2):57-63

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M (2006) Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 29(11):647-654

Simola N, Fenu S, Baraldi PG, Tabrizi MA and Morelli M (2004) Blockade of adenosine A2A receptors antagonizes parkinsonian tremor in the rat tacrine model by an action on specific striatal regions. *Exp. Neurol.* 189:182-188

[Stähle L](#), [Arner P](#), [Ungerstedt U](#). (1991). Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. [Life Science](#) 49(24):1853-1858

Svenningsson P and Bertil B. Fredholm (1997) Glucocorticoids Regulate the Expression of Adenosine A1 but not A2A Receptors in Rat Brain 280(2): 1094 –1101

Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 59: 355-396

Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB (1995) Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J Neurosci* 15, 7612-7624

Trevitt J, Vallance C, Harris A, G Tamara (2009) Adenosine antagonists reverse the cataleptic effects of haloperidol: Implications for the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 92:521–527

Uchiyama H, Toda A, Imoto M, Nishimura S, Kuroki H, Soeda S, et al (2010). The stimulatory effects of caffeine with oseltamivir (Tami"u) on light-dark behavior and open-field behavior in mice. *Neurosci Lett* 469:184–188

Uhde TW, Boulenger JP, Jimerson DC and Post RM (1984) Caffeine: relationship to human anxiety, plasma MHPG and cortisol. *Psychopharmacol Bull* 20:426-430

Von Lubitz DK (1999) Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur J Pharmacol* 371:85–102.

Weckerle CS, Stutz MA, Baumann TW (2003) Purine alkaloids in Paullinia. *Psytochemistry* 64:735-742

Yesair [DW](#), [Branfman AR](#), [Callahan MM](#) (1984). Human disposition and some biochemical aspects of methylxanthines. [Prog Clin Biol Res.](#) 1984;158:215- 233

Zhang Q, Yu YP, Ye YL, Zhang JT, Zhang WP, Wei WQ (2011) Spatiotemporal properties of locomotor activity after administration of central nervous stimulants and sedatives in mice. *Pharmacol biochem Behav* 97:577-585

1026

UNIVERSITAT
JAUME I