



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale

**Corso di laurea Magistrale in Neuroscienze e
Riabilitazione neuropsicologica**

Tesi di laurea magistrale

**Effetti dell'assunzione di caffeina sulla variabilità della frequenza
cardiaca e sulla frequenza di ammiccamento**

Effects of caffeine assumption on heart rate variability and blink rate

Relatore:

Prof. A. Angrilli

Correlatrice:

Dott.ssa F. Fusina

Laureanda: Cecchetti Chiara

Matricola: 2014928

Anno Accademico 2022/2023

SOMMARIO

ABSTRACT	6
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	8
1.1 Il sistema cardiovascolare.....	8
1.1.1 Anatomia e fisiologia del sistema cardiovascolare	8
1.1.2 Controllo centrale e autonomico	11
1.1.3 Registrazione del segnale: elettrocardiografia (ECG).....	15
1.1.4 La variabilità della frequenza cardiaca (Heart Rate Variability - HRV).....	17
1.1.5 Tecniche di misurazione della variabilità della frequenza cardiaca	20
1.2 La frequenza di ammiccamento (o <i>blink rate</i>)	24
1.2.1 Ammiccamento spontaneo come indice di stati cognitivi ed emotivi.....	26
1.2.2 Meccanismi centrali e circuiti neurali	33
1.2.3 Tecniche di registrazione del segnale	37
1.2.4 Possibili ambiti di utilizzo.....	39
1.3 La caffeina	41
1.3.1 Farmacocinetica	42
1.3.2 Farmacodinamica	43
1.3.3 Effetti farmacologici	44
1.3.4 Meccanismo d'azione	48
1.3.5 Tolleranza e dipendenza.....	50
1.3.6 Benefici e rischi	51
1.4 Caffeina e sistema cardiovascolare.....	55
1.5 Caffeina e frequenza di ammiccamento	61

CAPITOLO 2: METODO	65
2.1 Ipotesi e obiettivi.....	65
2.2 Partecipanti.....	69
2.3 Questionari.....	70
2.3.1 Positive Affect and Negative Affect Scales (PANAS)	70
2.3.2 State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y)	71
2.4 Materiale e stimoli	72
2.5 Procedura sperimentale	73
2.6 Analisi dei dati e analisi statistica	75
CAPITOLO 3: RISULTATI	76
3.1 Questionari.....	76
3.2 Risultati psicofisiologici	77
3.2.1 Frequenza cardiaca.....	77
3.2.2 Variabilità della frequenza cardiaca.....	77
3.2.3 Frequenza di ammiccamento	78
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	80
4.1 Discussione	80
4.1.1 PANAS e STAI-Y.....	81
4.1.2 Variabili cardiovascolari	81
4.1.3 Frequenza di ammiccamento	83
4.2 Conclusioni.....	84
BIBLIOGRAFIA	87

ABSTRACT

La caffeina è la sostanza psicoattiva più consumata al mondo e questa sua grande diffusione è dovuta ai numerosi effetti positivi che essa è in grado di esercitare sul nostro organismo. La letteratura in merito agli effetti stimolati dal suo consumo è vasta, anche se i risultati presentano delle controversie e possono essere discordanti fra loro, spesso a causa dell'ampia variabilità che questo tipo di studi presenta. Volendo identificare una tendenza comune a livello psicofisiologico, la caffeina viene ormai considerata una sostanza con effetti stimolanti a livello centrale, ma non necessariamente a livello periferico; sembrerebbe, infatti, che la caffeina aumenti, da un lato, l'arousal dopaminergico a livello neurale e causi, dall'altro, un rilassamento generalizzato a livello periferico, e ciò sarebbe comprovato da diversi studi che hanno riscontrato un aumento della variabilità della frequenza cardiaca in seguito all'assunzione di questa sostanza. Alla luce di queste informazioni, il presente studio ha voluto indagare le caratteristiche degli effetti dell'assunzione di caffeina sul nostro organismo, in particolar modo analizzando tre indici psicofisiologici: la frequenza cardiaca, la variabilità della frequenza cardiaca e la frequenza di ammiccamento (o blink rate), indice fisiologico, quest'ultimo, correlato all'attività dopaminergica centrale. In base alle conoscenze preesistenti, è stato ipotizzato un effetto significativo della caffeina su due di queste variabili: nello specifico, era atteso un aumento sia della variabilità della frequenza cardiaca che della frequenza di ammiccamento spontaneo in seguito all'assunzione di caffeina, mentre nessun tipo di cambiamento era atteso nei confronti della frequenza cardiaca. È stato strutturato uno studio di tipo entro-i-soggetti, nel quale 34 partecipanti sono stati sottoposti alla somministrazione a doppio cieco di una bevanda che poteva contenere caffeina (200 mg) oppure un placebo. Sono stati registrati i parametri psicofisiologici in modo non continuo, andando a rilevare le risposte psicofisiologiche dei soggetti con registrazioni di un minuto tra un task e l'altro; i compiti erano dei task controbilanciati che avevano il solo scopo di creare una situazione in cui i partecipanti fossero impegnati in delle attività, così da rendere la situazione sperimentale più ecologica. I risultati ottenuti da questo esperimento hanno confermato le ipotesi iniziali, dimostrando un aumento della frequenza di ammiccamento e della variabilità della frequenza cardiaca, mentre non sono state riscontrate modifiche significative della frequenza cardiaca a seguito dell'assunzione di caffeina.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Il sistema cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare è un sistema fisiologico complesso, soggetto al controllo di diverse strutture legate all'azione sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico, sia della branca autonoma simpatica che parasimpatica. Lo studio dell'organizzazione e del funzionamento di questo sistema è centrale in molti settori diversi, dalla psicofisiologia alla clinica e non solo. Numerose sono le ragioni che suscitano questo forte interesse nei confronti del sistema cardiovascolare: a partire da esso, infatti, diversi parametri possono essere misurati e quantificati, parametri dai quali si possono raccogliere informazioni in merito ai numerosi sottosistemi regolatori che sono alla base del suo funzionamento. Inoltre, il sistema cardiovascolare sembra essere coinvolto in diverse varietà di disturbi, non solo di tipo fisico ma anche psicosomatico, come ad esempio lo stress. Per queste diverse motivazioni, negli anni si sono accumulate molte informazioni riguardanti questo sistema, il che ha portato ad avere un quadro sempre più chiaro dei meccanismi alla base della sua organizzazione e delle sue interazioni con il resto dell'organismo, incluso il sistema nervoso centrale.

1.1.1 Anatomia e fisiologia del sistema cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare è costituito dal cuore, una pompa, e dal sistema vascolare, un complesso sistema di vasi sanguigni che si occupa della distribuzione del sangue a tutti i tessuti corporei. Il cuore è un organo grande circa come un pugno chiuso, che pesa da 250 a 350 grammi e che pulsa approssimativamente 100.000 volte al giorno e 2.5 miliardi di volte nell'arco di una vita. Il cuore è costituito da due atri e due ventricoli: i primi occupano la sezione superiore dell'organo e nelle loro camere ricevono sangue venoso, mentre i secondi, che occupano gran parte del volume cardiaco, si trovano sotto gli atri e pompano il sangue dal cuore verso i polmoni e le arterie (Shaffer et al., 2014). Il cuore fornisce un consistente flusso di sangue ossigenato ai tessuti tramite un percorso a diverse tappe: durante la circolazione polmonare, invia il sangue deossigenato ai polmoni affinché venga ossigenato, mentre nella fase di circolazione sistemica questo sangue ossigenato viene inviato al resto del corpo (Figura 1.1). Più in dettaglio, il sangue deossigenato proveniente dalle vene cave inferiore e superiore entra nell'atrio destro del cuore, attraversa la

valvola tricuspide e defluisce nel ventricolo destro, dal quale sarà inviato ai polmoni attraverso l'arteria polmonare. Nei polmoni il sangue viene ripulito e ossigenato e, successivamente, questo sangue ossigenato viene trasportato dalle vene polmonari all'atrio sinistro, per poi scorrere nel ventricolo sinistro attraverso la valvola mitrale (o bicuspidale). Quando il ventricolo sinistro si contrae, il sangue viene espulso dal cuore attraverso l'aorta, entra in circolo nel sistema arterioso e viene quindi redistribuito a tutti i tessuti corporei. Nello specifico, il sangue dall'aorta scorre attraverso vasi di dimensioni sempre minori, passando prima dalle arterie, che si ramificano, poi, in arteriole più piccole, in metarteriole e, infine, in capillari, piccoli vasi sottili che permettono lo scambio di sostanze con i tessuti; tramite i capillari avviene, infatti, la distribuzione di ossigeno e nutrienti ai tessuti, mentre i prodotti di scarto, come il diossido di carbonio, sono qui accumulati per essere poi ripuliti durante la circolazione polmonare. Da qui il sangue torna a scorrere in vasi sempre più larghi, passando dalle venule, fino alle vene e poi alla vena cava inferiore e superiore, dalle quali il sangue torna nell'atrio destro e quindi nel cuore (Berntson et al., 2007).

La muscolatura cardiaca ha un ruolo importante in tutto questo processo, in quanto le fibre dei muscoli degli atri e dei ventricoli sono fondamentali per pompare il sangue in circolo; per questo la maggior parte della massa cardiaca è costituita da tessuto muscolare, o miocardio. Il cuore, infatti, è costituito da tre strati: il pericardio, il miocardio e l'endocardio. Il pericardio è la membrana esterna che avvolge il cuore e che contiene un liquido che permette al cuore di muoversi senza fare attrito o incontrare resistenza da parte dei tessuti circostanti. Il miocardio è un muscolo striato involontario, con proprietà in parte diverse da quelle dei muscoli scheletrici sotto controllo volontario, ed è costituito dalle cellule del tessuto muscolare striato e da cellule auto-ritmiche non contrattili; le prime si occupano della contrazione, mentre le seconde danno origine allo stimolo necessario per la contrazione, in quanto sono in grado di autodepolarizzarsi. L'endocardio costituisce, invece, la membrana che riveste internamente tutte le cavità cardiache. Una peculiarità delle fibre muscolari che costituiscono il miocardio è il fatto che le loro cellule sono connesse le une con le altre non tramite sinapsi ma tramite giunzioni comunicanti che formano una sorta di sincizio funzionale; queste fibre muscolari specializzate sono elettricamente interconnesse fra loro per permettere la rapida diffusione dell'impulso elettrico da un punto a un altro del cuore, il che, a sua volta, permette di ottenere un'attività elettrica sincrona e coordinata anche in un organo grande come il cuore.

Il ciclo cardiaco funziona, dunque, grazie ad eventi meccanici e pressori che sono a loro volta determinati da input di tipo elettrico: infatti, le cellule auto-ritmiche che si trovano nel miocardio generano spontaneamente potenziali elettrici, e funzionano così come dei “pacemaker” naturali che danno inizio alle contrazioni cardiache e permettono la conduzione del potenziale lungo tutto il miocardio. I due principali “pacemaker” cardiaci responsabili della generazione del battito cardiaco sono il nodo senoatriale (SA) e il nodo atrioventricolare (AV) (Shaffer et al., 2014). Il nodo senoatriale si trova a livello dell’atrio di destra, sotto alla vena cava superiore e può essere considerato come il “pacemaker primario”, in quanto la velocità di depolarizzazione spontanea di questo nodo è tipicamente più veloce di quella del nodo atrioventricolare, e quindi normalmente è la depolarizzazione di questo nodo che controlla la frequenza del battito cardiaco. Tramite un sistema di fibre internodali questi due nodi sono connessi, in modo che la scarica di depolarizzazione sia condotta dal nodo senoatriale a quello atrioventricolare (che si trova sempre nell’atrio di destra, al confine con i ventricoli) e da qui ai ventricoli tramite un tessuto di conduzione che permette la propagazione rapida e coordinata del potenziale d’azione e che comprende il fascio di His e le fibre del Purkinje, fasci di fibre che passano attraverso il setto tra il ventricolo destro e sinistro e irradiano tutti i ventricoli. In questo modo, il sistema di conduzione permette di trasmettere l’onda di depolarizzazione dagli atri ai ventricoli, così che la contrazione degli atri sia seguita in modo ordinato da quella dei ventricoli (Berntson et al., 2007).

Andando ad analizzare nel dettaglio il ciclo cardiaco, possiamo notare due fasi principali che lo compongono: una chiamata sistole o contrazione ventricolare e una fase denominata diastole o rilassamento ventricolare. Durante la sistole, il cuore pompa il sangue e la pressione sanguigna raggiunge il suo valore massimo, parametro che viene registrato per la misurazione della pressione sistolica. Durante la diastole, invece, i ventricoli si rilassano, il cuore si riempie di sangue, in preparazione alla fase successiva, e la pressione tocca i livelli più bassi; è in questa fase che è possibile rilevare la pressione diastolica (Shaffer et al., 2014). Il ciclo cardiaco inizia con la depolarizzazione del nodo senoatriale nell’atrio destro durante l’ultima parte della diastole; la depolarizzazione passa lungo i muscoli dell’atrio, gli atri si contraggono, il che porta i ventricoli a contrarsi e inizia la fase di sistole. Durante la contrazione ventricolare, la pressione nei ventricoli è abbastanza alta da far chiudere la valvola atrioventricolare tra atri e ventricoli; dopo la contrazione, la pressione nei ventricoli crolla sotto la pressione degli atri, la valvola si apre e il sangue inizia rapidamente a fluire verso i ventricoli. Quando i ventricoli iniziano a contrarsi,

aumenta la pressione al loro interno e quando questa pressione arriva ad essere più alta di quella aortica, si apre la valvola aortica, e il sangue defluisce nel sistema di circolazione, con una rapida caduta del volume ventricolare. Nella fase di contrazione ventricolare, i ventricoli si ripolarizzano e questo corrisponde all'inizio del rilassamento dei ventricoli e all'inizio della diastole (Berntson et al., 2007). La depolarizzazione che avviene a livello cardiaco è diversa da quella tipica di altri muscoli scheletrici, in quanto, dopo il picco, vi è una fase di depolarizzazione sostenuta o plateau di circa 0.2-0.3 secondi prima che il muscolo si ripolarizzi; questo meccanismo fa sì che sia possibile una contrazione più prolungata del muscolo cardiaco, il che permette un'azione di pompaggio del sangue più efficiente, in quanto è necessario del tempo perché il sangue viaggi dagli atri ai ventricoli, prima che i ventricoli si contraggano. Un plateau simile può essere riscontrata anche nella depolarizzazione delle fibre del Purkinje, anche se la velocità di conduzione del segnale qui è ancora più rapida rispetto a quella dei muscoli atriali e ventricolari, probabilmente così da permettere che la scarica di depolarizzazione possa raggiungere rapidamente i muscoli ventricolari (Berntson et al., 2007).

1.1.2 Controllo centrale e autonomico

Il sistema cardiovascolare è regolato da diversi meccanismi di controllo, che vanno da processi autoregolatori intrinseci a processi di controllo esterno al quale partecipano diversi sistemi, come quello autonomo e ormonale, fino ad arrivare a un controllo di tipo centrale, sia da parte del sistema di riflessi a livello del tronco encefalico che di meccanismi più complessi a livello neurale.

Per quanto riguarda il sistema nervoso autonomo, il sistema cardiovascolare è sotto il controllo sia del ramo simpatico che parasimpatico ed è importante ai fini della ricerca analizzare in che modo queste due branche interagiscono fra di loro nel controllo cardiaco. Il cuore è, infatti, sottoposto a tre tipi di controllo da parte del sistema nervoso autonomo, con sistema simpatico e parasimpatico che hanno ruoli e importanza diverse a seconda della tipologia interessata. Si parla di controllo di tipo cronotropo, volto a regolare la frequenza del battito cardiaco, dromotropo, che controlla la velocità di conduzione dell'impulso elettrico, e controllo inotropo, che regola la contrattilità del muscolo cardiaco. Le proiezioni pregangliari di tipo simpatico e parasimpatico originano da diverse strutture, rispettivamente dai motoneuroni all'interno delle colonne cellulari intermedio-laterali nel midollo (soprattutto a livello dei segmenti toracici) e dal nucleo ambiguo e nucleo motorio dorsale del nervo vago. Queste fibre innervano poi diverse parti del cuore, e, a seconda

del tipo di innervazione prevalente e di come esse interagiscono, si possono avere diversi output a livello cardiaco: per esempio, il sistema parasimpatico esercita un controllo più ampio e flessibile sull'azione cronotropa cardiaca rispetto al ramo simpatico, mentre la branca simpatica del sistema nervoso autonomo ha effetti predominanti a livello del controllo inotropo. Il controllo cronotropo del periodo cardiaco è piuttosto lineare in relazione all'attività parasimpatica, mentre si riscontra della non linearità nell'azione della branca simpatica. Un'altra differenza fra sistema simpatico e parasimpatico è riscontrata nelle dinamiche temporali; infatti, il sistema parasimpatico ha una minor latenza d'azione, un tempo di reazione più rapido e una capacità di frequenza maggiore (ciò è molto probabilmente alla base del contributo selettivo del controllo vagale nei confronti della banda ad alta frequenza della variabilità della frequenza cardiaca correlata all'aritmia sinusale respiratoria). D'altro canto, il sistema simpatico sembra esser quello dominante nel controllo della contrattilità cardiaca; infatti, anche se l'attività parasimpatica esiste, in quanto è stata riscontrata innervazione parasimpatica dei ventricoli, se il sistema parasimpatico viene stimolato in assenza di attivazione simpatica, ciò non sembra avere effetti se non minimi a livello della contrattilità cardiaca, oltre a un effetto secondario di rallentamento della frequenza cardiaca. Probabilmente, molta dell'innervazione parasimpatica a livello ventricolare rappresenta delle terminazioni presinaptiche che terminano su sinapsi di tipo simpatico, il che permetterebbe un controllo inibitorio di tipo vagale sul controllo inotropo di tipo simpatico. In ogni caso, come possiamo evincere da questa breve descrizione di alcuni dei meccanismi coinvolti nella regolazione cardiaca da parte del sistema autonomo, le interazioni tra queste due branche sono multiple e complesse, da qui l'importanza di continuare ad analizzarle.

I due rami del sistema autonomo non esercitano le loro influenze solo a livello del miocardio, ma sono in grado di regolare anche il sistema vascolare, sistema fondamentale nel mantenere stabile la pressione sanguigna e mantenere in equilibrio la differenza tra pressione arteriosa e venosa, funzione alla base della distribuzione del sangue in tutto l'organismo. Nella regolazione di questo complesso sistema di muscolatura vascolare, troviamo di nuovo l'azione di entrambe le divisioni autonome, con il ramo simpatico che sembra avere un ruolo predominante.

Va citata brevemente anche l'importanza che il sistema ormonale ha nella regolazione del ciclo cardiaco, considerando ad esempio il ruolo che ricopre nel mantenere un buon equilibrio acqua/elettroliti nell'organismo, e quindi svolgendo un ruolo importante nella regolazione del

volume e della pressione sanguigna, nella redistribuzione dell'acqua e, di conseguenza, anche nella regolazione cardiovascolare (Berntson et al., 2007).

Un altro fattore che influenza il funzionamento cardiaco sono i riflessi del tronco encefalico, tra i quali i più importanti a livello cardiaco sono i riflessi legati ai barocettori, inclusi i riflessi barocettivi cardiaco e vascolare. I barocettori sono meccanoettori sensibili allo stiramento localizzati principalmente a livello delle carotidi e dell'arco aortico, le cui proiezioni arrivano a livello del nucleo del tratto solitario (uno dei centri encefalici che riceve la maggior parte delle informazioni viscerali). A livelli normali di pressione arteriosa a riposo, molti barocettori riportano informazioni sulla pressione sanguigna e i riflessi barocettivi modulano l'attività autonoma. Quando vi è un aumento pressorio, il tessuto delle carotidi e dell'arco aortico si distende e questo aumentato stiramento dei tessuti aumenta l'attivazione dei barocettori; essi iniziano, così, a scaricare più frequentemente nella direzione del nucleo del tratto solitario, il quale utilizza la frequenza di scarica dei barocettori come misura della pressione sanguigna. Più frequentemente scaricano, più questo nucleo verrà attivato, più esso inibirà i centri vasomotori e stimolerà i nuclei vagali. Il risultato finale dell'attivazione dei barocettori in seguito a un aumento pressorio è l'inibizione dell'attività simpatica a favore di un'attivazione parasimpatica; in questo modo, i riflessi barocettivi sono in grado di massimizzare la riduzione della pressione sanguigna quando viene rilevata come troppo alta. Quest'attività di controllo risulta di fondamentale importanza nel mantenimento di un equilibrio a livello della pressione sanguigna; l'aumento dell'attività parasimpatica unito al decremento di quella simpatica diminuisce la frequenza cardiaca e la contrattilità ventricolare, mentre il ritiro simpatico risulta anche in una vasodilatazione che contribuisce ulteriormente all'abbassarsi della pressione. Lo stesso è possibile nella direzione opposta, come nel caso dell'assunzione della posizione eretta, dove un repentino abbassamento della pressione a causa della gravità (stress ortostatico) è mediato dall'attività dei barocettori, che permettono una maggior attivazione simpatica con inibizione vagale, in modo da aumentare la pressione sanguigna. Una minor capacità di riflessi barocettivi sembra esser correlata con difficoltà nella capacità di autoregolazione e con l'invecchiamento. (Berntson et al., 2007; Shaffer et al., 2013; Shaffer et al., 2014).

Come possiamo evincere da questa breve descrizione dei riflessi barocettivi, il controllo che i riflessi esercitano sul funzionamento cardiovascolare è vasto, ma esso non è indipendente dalla

regolazione da parte di strutture neurali superiori; meccanismi neurali superiori possono, infatti, intervenire nella regolazione dei flussi autonomici, inibendo o bypassando i meccanismi legati ai riflessi, come, ad esempio, nel caso della soppressione del riflesso barocettivo a causa dello stress. I meccanismi di controllo neurali superiori sono più flessibili dei riflessi del tronco encefalico; il cervello può intervenire nella regolazione cardiaca tramite diverse vie e, infatti, in letteratura sono state descritte diverse proiezioni monosinaptiche verso il tronco encefalico da aree superiori e strutture che sono implicate in processi cognitivi e comportamentali, tra cui l'ipotalamo, l'amigdala e la corteccia prefrontale. Ad esempio, uno studio neuroanatomico di tracciamento retroattivo del 1996 ha indagato quali fossero le aree neurali coinvolte nella regolazione autonoma nei ratti e ha identificato aree come il nucleo del tratto solitario, il midollo ventrolaterale, i nuclei del rafe (che danno origine alle proiezioni serotoninergiche sia ascendenti che discendenti) e il gruppo di cellule A5 (che dà origine alle proiezioni noradrenergiche sia ascendenti che discendenti). E' stato riscontrato anche il coinvolgimento di strutture importanti per processi cognitivi ed emotivi come la sostanza grigia periacqueduttale, l'ipotalamo, l'amigdala, il giro cingolato anteriore e la corteccia frontale e prefrontale (Ter Horst et al., 1996). Negli ultimi decenni, si stanno utilizzando sempre più combinazioni di tecniche di neuroimaging e misure autonome, il che sta permettendo di identificare con sempre più precisione quali aree neurali sono coinvolte nella regolazione cardiaca. Diversi studi PET e fMRI hanno identificato come coinvolte nel controllo autonomico varie aree normalmente implicate in processi psicologici, come la corteccia cingolata, la corteccia orbito-frontale, la corteccia insulare e la corteccia prefrontale mediale e dorsolaterale, così come aree collegate quali ipotalamo, amigdala e cervelletto (Chritchley et al., 2005; Gianaros et al., 2005; Lane et al., 2001). E' stato anche riscontrato che l'entità della risposta cardiovascolare è significativamente correlata all'entità dell'attivazione di specifiche regioni neurali. La sovrapposizione di aree neurali che sono implicate sia in processi cognitivi ed emotivi che nel controllo cardiovascolare mostra la stretta relazione esistente fra substrati neurali e autonomici, relazione che sottostà al normale funzionamento psicofisiologico. La speranza è che questo tipo di studi possano aiutare a chiarire sia il funzionamento dei singoli sistemi di controllo neurali e periferici, ma anche le connessioni che esistono tra stati psicologici, processi cognitivi e risposte cardiovascolari, in relazione anche alle condizioni di salute (Berntson et al., 2007).

1.1.3 Registrazione del segnale: elettrocardiografia (ECG)

L'elettrocardiografia consiste nella registrazione nel tempo della differenza di potenziale elettrico generata dal muscolo cardiaco. Il segnale che si registra rappresenta il risultato di potenziali d'azione di milioni di cellule del muscolo cardiaco e la loro sequenza ciclica di depolarizzazione e ripolarizzazione. Questo segnale elettrico che viene rilevato è costituito da una serie di onde riconoscibili perché diversamente caratterizzate per ampiezza e frequenza, ciascuna delle quali corrisponde a un evento preciso. E' un metodo diagnostico non invasivo che permette di rilevare il segnale elettrico cardiaco grazie all'utilizzo di elettrodi posti sulla superficie corporea, in quanto il tessuto che circonda il miocardio è conduttivo e quindi fa sì che i potenziali arrivino fino alla superficie esterna del corpo, dove possono essere misurati.

Il triangolo di Einthoven è il principio fisiologico su cui si basa la rilevazione dell'attività elettrica cardiaca. Si basa sulla disposizione immaginaria di un triangolo equilatero rovesciato sul torace della persona, il cui centro coincide con il cuore. Ogni angolo della figura coincide con un punto di un arto specifico, e questi punti sono usati come punti di riferimento nelle registrazioni elettrocardiografiche. Esistono diverse configurazioni che permettono di registrare un segnale elettrocardiografico con diversi numeri di derivazioni: esistono derivazioni unipolari, del braccio destro (aVR), del braccio sinistro (aVL) e della gamba sinistra (aVF) e bipolari di tipo I (braccio sinistro-braccio destro), II (gamba sinistra-braccio destro) e III (gamba sinistra-braccio sinistro), con la gamba destra che funziona da ground. Queste configurazioni sono spesso approssimate e gli elettrodi vengono spesso posti sul torace, piuttosto che sugli arti. La possibilità di utilizzare diverse derivazioni è importante per avere diverse prospettive sugli eventi del ciclo cardiaco (Berntson et al., 2007).

Il ciclo cardiaco registrato con l'ECG può essere osservato su un tacogramma, ossia un grafico che rappresenta in sequenza gli intervalli di tempo che intercorrono tra le onde R (Shaffer et al., 2014). Il ciclo cardiaco appare, così, composto da cinque diversi eventi: abbiamo l'onda P che corrisponde alla diffusione della depolarizzazione dal nodo senoatriale attraverso gli atri, il complesso QRS che rappresenta l'arrivo dell'onda a livello dei ventricoli, e l'onda T che chiude il ciclo cardiaco, in quanto è indice della ripolarizzazione dei ventricoli. Per una configurazione standard con lead II, l'onda Q riflette la depolarizzazione del setto ventricolare, seguita dall'azione di pompaggio del

miocardio ventricolare rappresentata dall'onda R. L'onda T, pur rappresentando la fase di ripolarizzazione, ha normalmente la stessa polarità dell'onda R (Berntson et al., 2007).

In un cuore in salute, il nodo senoatriale dà inizio ad ogni ciclo cardiaco attraverso la depolarizzazione spontanea delle sue fibre con una frequenza di scarica intrinseca di circa 60-100 potenziali al minuto. In seguito, il nodo atrioventricolare rallenta la frequenza di scarica originaria fino a 40-60 depolarizzazioni al minuto. L'impulso elettrico del nodo senoatriale viaggia attraverso gli atri e raggiunge il nodo atrioventricolare in circa 0.03 secondi causando la sua depolarizzazione; questo evento elettrico viene registrato dall'ECG come onda P prodotta dalla depolarizzazione e quindi dalla contrazione delle cellule muscolari degli atri, detta sistole atriale. Il segnale si diffonde rapidamente attraverso i percorsi di collegamento cardiaci, come il fascio di His e le fibre di Purkinje, che conducono il potenziale verso entrambi i ventricoli dopo circa 0.2 secondi dall'onda P dell'ECG. La contrazione dei ventricoli risulta nel complesso QRS dell'ECG che viene seguita dal segmento S-T; il complesso QRS corrisponde quindi alla sistole ventricolare che si estende fino alle onde S e T generate dalla ripolarizzazione dei ventricoli, o diastole ventricolare, la quale avviene circa 0.6 secondi dopo l'inizio dell'onda P (Shaffer et al., 2014).

Utilizzando un ECG possiamo identificare il “periodo cardiaco”, ossia il tempo misurato in millisecondi che intercorre tra due battiti cardiaci adiacenti, registrato tipicamente tra due onde R successive nell'ECG. Tradizionalmente, questa misura viene considerata il reciproco della misura della frequenza cardiaca, espressa invece in battiti per minuto (bpm, beats per minute), permettendo così di convertire il periodo cardiaco in frequenza cardiaca e viceversa. Queste due misure, però, non sono linearmente correlate l'una con l'altra: infatti, la relazione tra i cambiamenti del sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico e il periodo cardiaco risulta essere più lineare di quanto lo sia la relazione tra i cambiamenti del sistema autonomo e la frequenza cardiaca. Di conseguenza, i cambiamenti che avvengono a livello del sistema autonomo, sia simpatico che parasimpatico, portano approssimativamente allo stesso cambiamento nel periodo cardiaco, cosa che invece non avviene per la frequenza cardiaca. Questa relazione non lineare per quanto riguarda la frequenza cardiaca rende ancora più complesse le interazioni tra i due rami del sistema nervoso autonomo nel controllo cardiaco. Tuttavia, sembrerebbe che le interazioni fra sistema simpatico e parasimpatico abbiano maggiore effetti sulla frequenza cardiaca piuttosto che sul periodo cardiaco. Quando si misura la frequenza cardiaca, è importante considerare anche il sistema metrico

utilizzato, in quanto l'entità del cambiamento a livello cardiaco conseguente alle manipolazioni sperimentali può differire in modo considerevole in base al sistema utilizzato per descrivere le funzioni cardiache. Tenendo in considerazione quanto appena detto, si è giunti alla conclusione che un aumento della frequenza cardiaca può esser dovuto ad un aumento dell'attività simpatica, a un decremento dell'attività parasimpatica o ad una combinazione delle due; da non scordare, inoltre, che potrebbe anche essere il risultato dell'influenza di processi di tipo cognitivo ed emotivo (Berntson et al., 2007).

1.1.4 La variabilità della frequenza cardiaca (Heart Rate Variability - HRV)

Walter Cannon introdusse nel 1929 il concetto di omeostasi e da quel momento lo studio della psicofisiologia si è basato sul principio che le cellule, i tessuti e gli organi concorrono a mantenere una condizione stabile e costante all'interno del loro organismo. Nel corso degli anni, però, grazie anche all'introduzione di tecniche di analisi del segnale che permettono di acquisire diversi parametri in modo continuo nel tempo, è diventato sempre più chiaro il fatto che i processi biologici variano in un modo complesso e non lineare, anche durante le condizioni di riposo. Oggi siamo, dunque, arrivati a pensare che un funzionamento fisiologico sano sia il risultato di continue interazioni dinamiche tra diversi meccanismi di controllo (neurali, ormonali, meccanici), sia a livello centrale che periferico (Shaffer et al., 2004). Attualmente, ad esempio, sappiamo che il normale ritmo cardiaco a riposo è irregolare; grazie a tecniche di registrazione sempre più affinate, siamo riusciti a scoprire che la frequenza cardiaca di una persona sana a riposo non è regolare, bensì presenta delle fluttuazioni nel tempo, che emergono chiaramente dall'analisi battito per battito della frequenza cardiaca. Questo comportamento irregolare dell'attività cardiaca è il risultato delle diverse interazioni fra sistemi fisiologici, tra i quali il sistema nervoso autonomo, il sistema che controlla la pressione sanguigna e quello che si occupa di controllare la respirazione (Hirsch e Bishop, 1981; McCraty et al., 2009). In queste interazioni, quindi, l'attività del sistema nervoso simpatico e parasimpatico è integrata con l'attività nervosa intrinseca del cuore, inclusa l'attività dei recettori sensoriali del muscolo cardiaco (barocettori e chemocettori), attività che contribuisce ai cambiamenti che avvengono tra ogni battito (Shaffer et al., 2014). Nell'insieme, queste multiple influenze creano un sistema di controllo fisiologico dinamico che non è mai veramente a riposo e sicuramente mai statico. Negli individui sani, questo sistema rimane resiliente e responsivo, pronto ad agire se necessario.

Per questo motivo, nel corso degli ultimi decenni, individuare un indice che possa rispecchiare questo equilibrio dinamico dell'organismo è diventato un obiettivo sempre più importante e la variabilità della frequenza cardiaca (HRV) ha riscosso sempre maggior successo in tal senso; essa è considerata una misura del funzionamento neuro-cardiaco in grado di riflettere l'interazione tra cuore e cervello e l'equilibrio dinamico del sistema nervoso autonomo (McCraty et al., 2009; Shaffer et al., 2013; Shaffer et al., 2014). L'HRV rappresenta i cambiamenti a livello temporale tra battiti cardiaci consecutivi e, come già detto, è prodotta dall'interazione di diversi meccanismi regolatori che operano all'interno di diverse scale temporali (Task Force, 1996). I ritmi circadiani, la temperatura corporea interna, il metabolismo e gli ormoni contribuiscono tutti alle variazioni che si registrano nella variabilità della frequenza cardiaca, in particolar modo se si tiene in considerazione una registrazione di 24 ore, che rappresenterebbe il *gold standard* suggerito per una valutazione clinica dell'HRV (Task Force, 1996); i sistemi autonomo, cardiovascolare, respiratorio e nervoso centrale producono misure adatte a registrazioni più brevi, anche di pochi minuti. Un attore importante in queste dinamiche è il nervo vago, che può esser visto come un condotto attraverso il quale passano segnali afferenti provenienti dal cuore e da altri organi viscerali diretti verso il cervello, inclusi segnali relativi ai riflessi barocettivi. Infatti, anche i barocettori e i chemocettori influenzano l'attività della variabilità della frequenza cardiaca nell'arco di un breve periodo di tempo; ad esempio, nel caso dei barocettori, quando inspiriamo, la frequenza cardiaca aumenta, la pressione arteriosa aumenta circa 5 secondi dopo, i barocettori intercettano questo aumento e scaricano più rapidamente, mentre quando espiriamo, la frequenza cardiaca diminuisce, la pressione arteriosa crolla 5 secondi dopo e i barocettori diminuiscono la loro frequenza di scarica. I riflessi barocettivi rendono possibile questa accelerazione e decelerazione della frequenza cardiaca basata sulla respirazione attraverso il nervo vago e questo processo è chiamato aritmia sinusale respiratoria (RSA: Respiratory Sinus Arrhythmia) (Shaffer et al., 2013).

L'aritmia sinusale respiratoria è considerato il fenomeno alla base della variabilità della frequenza cardiaca; essa consiste in una variazione naturale della frequenza cardiaca che si verifica durante il ciclo respiratorio, è un meccanismo mediato dal nervo vago e sembra generare l'HRV (Lehrer, 2013). E' stato registrato, infatti, che durante l'inalazione, i centri cardiovascolari ritirano l'inibizione vagale dal nodo senoatriale, accelerando la frequenza cardiaca, mentre durante l'espiazione, questa inibizione vagale viene reintegrata, così che il cuore rallenti nuovamente

grazie al rilascio di acetilcolina (Eckberg e Eckberg, 1982). Tenendo in considerazione queste informazioni, possiamo notare che l'esistenza di una differenza temporale fra gli intervalli interbattiti durante cicli respiratori successivi, può dimostrare che il sistema cardiovascolare è in grado di modulare il tono vagale. Questa modulazione del tono vagale aiuta a mantenere un equilibrio dinamico autonomico, fondamentale per la salute del nostro cuore. Nel caso in cui vi sia un disequilibrio autonomico a causa di disfunzioni nel controllo inibitorio vagale, questo può essere un allarme che segnala rischi di malattie o mortalità (Thayer et al., 2010).

L'HRV viene, per questo, considerata come un possibile marker di malattie e di adattabilità dell'organismo (Shaffer et al., 2013, 2014). L'importanza clinica di questo indice era stata già notata nel 1965, quando è stato scoperto che il distress fetale è preceduto da alterazioni nella HRV prima di qualsiasi altro cambiamento a livello della frequenza cardiaca (Hon e Lee, 1963); negli anni '70, invece, le analisi dell'HRV sono state utilizzate per predire la neuropatia a livello autonomico in pazienti diabetici prima della comparsa dei sintomi (Ewing et al., 1976). Oggigiorno, una bassa variabilità della frequenza cardiaca viene vista come un forte fattore predittivo di futuri problemi di salute, in quanto considerata associata alla vulnerabilità nei confronti di stressor psicologici e fisici e di malattie. Una bassa HRV può essere un marker di malattie cardiovascolari (ipertensione, aritmia ventricolare, insufficienza cardiaca cronica e ischemia cardiaca) e può prevedere morte improvvisa da infarto. E' anche osservata in pazienti con disfunzioni autonome come pazienti con ansia, depressione, asma, e nel caso di vulnerabilità a morte improvvisa dei neonati. Questa correlazione tra basso HRV e mortalità e malattia potrebbe esser data dal fatto che l'HRV riflette una ridotta capacità di regolazione, ossia una ridotta capacità di rispondere in modo adattivo agli ostacoli e le sfide che si incontrano nella vita, come attività fisica o stressor. L'età dei soggetti può mediare la relazione tra ridotta HRV e capacità di regolazione, infatti l'HRV si riduce con l'età (Umetani et al., 1998); coerentemente, invecchiare implica cambiamenti a livello neurale, con perdita di neuroni a livello del cervello e del midollo spinale, il che potrebbe peggiorare la trasmissione del segnale e di conseguenza ridurre la capacità di regolazione. Una ridotta capacità regolativa può anche contribuire a problemi gastrointestinali, infiammazioni e ipertensioni. D'altro canto, l'HRV può anche essere un indicatore di resilienza psicologica e flessibilità comportamentale, in quanto riflette la capacità di adattarsi alle richieste sociali e ambientali in continuo cambiamento (Berntson et al., 2008). Molti studi, ad esempio, hanno dimostrato un'associazione tra maggiori livelli di HRV a riposo e

performance in compiti cognitivi che richiedono l'uso di funzioni esecutive (Thayer et al., 2009). Tecniche di stimolazione dell'HRV, come il biofeedback, possono contribuire ad aumentarla così da produrre miglioramenti nelle funzioni cognitive, come anche in un'ampia gamma di outcome clinici, inclusa la riduzione dei costi della spesa pubblica per la salute.

Esistono cinque principali teorie che integrano la variabilità della frequenza cardiaca nei loro modelli di spiegazione psicofisiologica, e una caratteristica comune a tutte è il ruolo primario che viene riconosciuto al tono vagale. Il modello dell'integrazione neuroviscerale (Thayer et al., 2009) postula l'esistenza di una connessione tra corteccia prefrontale e cuore attraverso il nervo vago; viene ipotizzato che maggiore è il tono vagale, migliori sono le capacità esecutive, la regolazione emotiva e lo stato di salute. Nel caso di qualsiasi interruzione in questo circuito, il risultato può essere un aumento dell'attività del sistema nervoso simpatico, caratteristico dei disturbi d'ansia. Il modello della frequenza di risonanza (Lehrer, 2013) sostiene che la variabilità della frequenza cardiaca rappresenta l'adattabilità dell'organismo e una maggior aritmia sinusale respiratoria rappresenta una miglior regolazione della pressione sanguigna, della frequenza cardiaca e degli scambi gassosi nell'organismo; questo modello vede nella respirazione lenta e ritmata un modo efficace per aumentare il tono vagale. Abbiamo poi la teoria polivagale (Porges, 2007), la quale associa un maggior tono vagale a un miglior funzionamento della persona dal punto di vista sociale e il modello biologico-comportamentale (Grossman e Taylor, 2007), che attribuisce al tono vagale un ruolo primario nella regolazione degli scambi energetici tramite la sincronizzazione di processi respiratori e cardiovascolari durante i cambiamenti metabolici e comportamentali. In quest'ultima teoria, un maggior tono vagale a riposo viene considerato adattivo, in quanto riflette una sorta di "scorta" di energia alla quale l'organismo può attingere nel caso di stati di attivazione. Infine, il modello della coerenza psicofisiologica (McCraty e Childre, 2010) sostiene, similmente a Porges, che un tono vagale maggiore può essere raggiunto tramite una respirazione lenta e ritmata; questa respirazione associata con emozioni positive può produrre un ampio range di risposte positive associate alla salute personale, sociale e globale.

1.1.5 Tecniche di misurazione della variabilità della frequenza cardiaca

La tecnica più comunemente utilizzata per registrare un segnale dal quale risalire a questa misura è l'elettrocardiogramma (ECG), e il modo più comune per osservare queste fluttuazioni temporali della frequenza cardiaca è tramite l'utilizzo di un tacogramma, il quale, come già descritto

precedentemente, ci permette di osservare in sequenza gli intervalli di tempo che intercorrono tra le onde R. Può essere utilizzata anche la fotopletiografia, che misura le variazioni di volume sanguigno (utile per risalire a valori relativi alla pressione sanguigna), ma si tende a preferire l'ECG in quanto gli algoritmi dei software che interpretano i dati tendono a riconoscere più facilmente il picco acuto dell'onda R piuttosto che quello più ricurvo delle pulsazioni relative al volume sanguigno. Nella maggior parte dei casi, quindi, le misurazioni dell'HRV vengono calcolate a partire dall'intervallo inter-battito (IBI) generato dal segnale dell'ECG (Shaffer et al., 2014).

Un ampio range di misure sono state utilizzate per ricavare la variabilità della frequenza cardiaca, ma l'analisi di questo indice viene fatta principalmente in due domini: nel dominio del tempo e della frequenza del segnale (Shaffer et al., 2014; Laborde et al., 2017). In entrambi i metodi, vengono come prima cosa determinati gli intervalli di tempo tra un complesso QRS e quello successivo (Shaffer et al., 2014). E' importante riconoscere che le rappresentazioni nel dominio del tempo o della frequenza sono due modi complementari di caratterizzare lo stesso insieme di variabili, con la prima che conserva l'integrità temporale del segnale a spese della risoluzione della frequenza e la seconda che preserva la composizione della frequenza del segnale, a spese della risoluzione temporale (Berntson et al., 2007).

Gli indici nel dominio del tempo sono statistiche descrittive che riflettono la distribuzione dei periodi cardiaci nell'arco temporale di registrazione. Sono, quindi, indici che quantificano la variabilità esistente negli intervalli inter-battito usando misure statistiche e sono le misure più semplici da calcolare. Sono misure molto utilizzate, in quanto sono calcolate sempre allo stesso modo, così da permettere ai dati di diverse ricerche di essere confrontabili fra di loro (se presi nello stesso arco temporale e nelle stesse condizioni sperimentali). Esistono diversi indici nel dominio del tempo (Berntson et al., 2007; Shaffer et al., 2014):

- SDNN: è la deviazione standard degli intervalli inter-battiti normali (vengono rimossi quelli anormali) misurata in millisecondi. Viene considerato come un indice sia di attività simpatica che parasimpatica e sembra essere altamente correlato con le bande a bassa frequenza (LF) e a molto bassa frequenza (VLF) (Umetani et al., 1998). L'indice è più accurato se registrato in un arco di tempo di 24 ore, piuttosto che per intervalli brevi. E' considerato come *gold*

standard nella pratica medica per individuare, tramite l'utilizzo di un Holter, dei potenziali rischi a livello cardiaco (Task Force, 1996).

- SDRR: è la deviazione standard degli intervalli inter-battiti considerando tutti i battiti (anche quelli anormali o falsi) misurata in millisecondi.
- SDANN: è la deviazione standard della media degli intervalli inter-battiti (Shaffer et al., 2014).
- pNN50: è la percentuale di intervalli inter-battiti adiacenti che differiscono l'uno dall'altro per più di 50 millisecondi. E' correlata con l'attività parasimpatica (Umetani et al., 1998).
- HR max-HR min: è la differenza media tra il picco più alto e quello più basso della frequenza cardiaca durante ogni ciclo respiratorio (Shaffer et al., 2014). E' un indice particolarmente sensibile agli effetti della frequenza respiratoria; non rappresenta direttamente il tono vagale, ma riflette piuttosto l'aritmia sinusale respiratoria (RSA).
- RMSSD: è il valore quadratico medio delle differenze tra battiti cardiaci adiacenti. E' un valore ottenuto calcolando, come prima cosa, ogni differenza di tempo tra un battito e l'altro in successione, in millisecondi; viene, poi, fatta la radice quadrata di ogni valore, e poi viene fatta la media del risultato (Shaffer et al., 2014). La RMSSD riflette le variazioni battito per battito della frequenza cardiaca ed è la misura nel dominio del tempo più usata per avere una stima dei cambiamenti mediati dall'attività vagale che si riflettono sull'HRV. Questa misura è mediata dall'attività parasimpatica e sembra fortemente correlata alla banda ad alta frequenza dell'HRV (HF) (Kleiger et al., 2005), mentre sembrerebbe relativamente indipendente dalle influenze della frequenza respiratoria (Schipke et al., 1999; Pentilla et al., 2001; Hill e Siebenbrock, 2009).

Nel dominio della frequenza, il segnale viene filtrato e suddiviso in bande di frequenza differenti e gli indici si ricavano applicando un'analisi di tipo matematico specifica (la trasformata veloce di Fourier; FFT – Fast Fourier Trasformation) alla serie di intervalli inter-battito ricavati dall'elettrocardiogramma; questo passaggio permette di calcolare lo spettro di potenza, che può poi essere diviso in diverse bande di frequenza (Task Force, 1996):

- HF (high frequency): potenza nelle bande di frequenza alte (0.15 – 0.4 Hz). Riflette principalmente il tono vagale e l'attività parasimpatica sul cuore (Task Force, 1996). Viene anche chiamata banda respiratoria perché corrisponde alle variazioni della frequenza cardiaca associate al ciclo respiratorio (Eckberg e Eckberg, 1982) ed è influenzata dal respiro quando questo ha una frequenza compresa tra 9 (0.15 Hz) e 24 (0.4 Hz) cicli al minuto (Task Force, 1996). E' anche un indice della sensibilità dei riflessi barocettivi, che regolano la pressione sanguigna e la frequenza cardiaca (Task Force, 1996).
- LF (low frequency): potenza nelle bande di frequenza basse (0.04 – 0.15 Hz). Associata alle influenze di entrambe le branche del sistema nervoso autonomo e fortemente influenzata dall'attività dei barocettori (Berntson et al., 2007; Task Force, 1996).
- VLF (very low frequency): il range di frequenza molto basso (0.0033 – 0.04 Hz). Non ci sono certezze riguardo i meccanismi fisiologici responsabili delle attività entro questa banda di frequenza (Kleiger et al., 2005), ma potrebbero contribuire alla sua generazione processi termoregolatori, il sistema renina-angiotensina e influenze endoteliali sul cuore (Task Force, 1996; Berntson et al., 1997). L'attività parasimpatica potrebbe influenzare questa banda, in quanto il blocco di questa attività sembra abolire questa banda di frequenza (Eckberg, 1998), mentre ciò non accade con il blocco dell'attività simpatica; ulteriore conferma sembrerebbe il fatto che questa banda di frequenza è riscontrata in persone tetraplegiche, nelle quali l'innervazione simpatica del cuore e dei polmoni è interrotta (Berntson et al., 1997; Task Force, 1996).
- ULF (ultra low frequency): il range di frequenza ultra basso (< 0.0033). Indica le fluttuazioni negli intervalli inter-battiti con un periodo dai 5 minuti alle 24 ore ed è misurato su registrazioni di 24 ore (Kleiger et al., 2005). E' un indice poco studiato e proprio per questo manca consenso sul suo ruolo e sui meccanismi che possano generarlo, anche se si pensa che possano contribuire processi biologici ad azione molto lenta, come ritmi circadiani, temperatura corporea interna, metabolismo e il sistema renina-angiotensina (Task Force, 1996).
- LF/HF ratio: esprime il rapporto tra la banda a bassa frequenza e quella ad alta frequenza e viene considerato un indice dell'equilibrio simpato-vagale nel funzionamento del sistema nervoso autonomo (Laborde et al., 2017); l'interpretazione è controversa a causa di disaccordi

relativi alle influenze della banda LF. Diverse critiche riportano, infatti, che la banda LF non indichi strettamente né chiaramente l'attivazione simpatica, in quanto spesso la componente simpatica dell'attività di questa banda varia a seconda delle condizioni sperimentali. Inoltre, l'interazione tra attività simpatica e parasimpatica non gode di una condizione di linearità e di reciprocità pura (Billman, 2013). Con molta cautela, dunque, si può considerare un rapporto basso come riflesso di una dominanza parasimpatica e può essere osservato quando conserviamo energia e ci impegnano in comportamenti *tend-and-befriend*. Un rapporto alto, invece, può indicare dominanza simpatica e può essere osservato quando ci impegniamo in comportamenti di *fight-or-flight*.

1.2 La frequenza di ammiccamento (o *blink rate*)

L'ammiccamento oculare (o *eye-blink*) è uno dei movimenti che avviene più frequentemente nell'uomo ed è un'azione condivisa con la maggior parte dei vertebrati e dei mammiferi (Blount, 1928; Hall, 1945). Quest'azione ha un ruolo importante a livello fisiologico, in quanto un'efficiente capacità di ammiccamento è un fattore critico per la salute della superficie oculare (McMonnies, 2010); diversi studi, infatti, hanno ormai comprovato la sua funzione nel mantenere l'integrità della cornea tramite la diffusione della pellicola lacrimale dimostrando che, se l'ammiccamento per qualsiasi motivo non avviene, questa pellicola diventa sempre più sottile fino alla lesione, causando dei veri e propri punti di rottura sulla cornea (Al-Abdulmunem, 1999). Ma che cos'è l'ammiccamento oculare? Si tratta di una rapida chiusura delle palpebre che normalmente coinvolge diversi muscoli, con la fase di chiusura causata dalla contrazione della porzione palpebrale del muscolo orbicolare dell'occhio e quella di apertura controllata dal muscolo elevatore della palpebra superiore (McMonnies, 2010). Un ammiccamento dura in media 0.25 secondi, con la fase di chiusura che tende ad essere due volte più veloce di quella di apertura, mentre per quanto riguarda la sua frequenza media viene preso in considerazione un range che va tra i 10 e i 25 ammiccamenti al minuto (McMonnies, 2010); ovviamente, velocità e frequenza variano molto sia a livello intraindividuale che interindividuale, dunque è difficile determinare una media precisa che possa rispecchiare tutta la popolazione. L'azione di chiudere e aprire le palpebre è uno dei movimenti che l'uomo fa più comunemente e, per quanto possa sembrare un'azione molto semplice, la ricerca ha identificato diversi meccanismi che vi sono alla base e diverse

funzioni che questa semplice azione svolge. Nello specifico, esistono evidenze ormai certe dell'esistenza di tre forme distinte di ammiccamento oculare: volontario, di riflesso e spontaneo (Stern et al., 1984; Evinger, 1995; McMonnies, 2010).

Il riflesso di ammiccamento consiste in una risposta di difesa dell'organismo nel momento in cui l'occhio è esposto a un rischio di danno reale o percepito; può avvenire, ad esempio, in seguito a una stimolazione con luci intense, a rumori forti, o in risposta all'irritazione causata da un corpo estraneo (McMonnies, 2010). E' anche il tipo di ammiccamento coinvolto nella diffusione delle lacrime allo scopo di mantenere la pellicola lacrimale intatta e la cornea lubrificata (Evinger, 1995). Oltre ad essere influenzato da diversi stimoli provenienti dalla cornea e da una varietà di stimoli sensoriali improvvisi, è coinvolto anche nel riflesso glabellare, un riflesso primitivo dell'occhio che consiste in una risposta di ammiccamento bilaterale elicitata da un tocco leggero della zona glabellare, una piccola area della fronte che si trova al di sopra della sutura naso-frontale, tra le arcate sopracciliari (Zametkin et al., 19; Karson, 1983). Il riflesso di ammiccamento viene anche chiamato riflesso trigemino-facciale in quanto collegato all'attività del quinto nervo cranico, ossia il nervo trigemino (Karson, 1983).

Con ammiccamento di tipo volontario, invece, si indica la chiusura delle palpebre che si fa coscientemente, in seguito a una decisione volontaria (Evinger, 1995); avviene in risposta a stimoli identificabili, normalmente in seguito a una decisione conscia del soggetto o su richiesta esplicita, ed è influenzato dalla natura delle istruzioni date (Stern et al., 1984).

Infine, l'ammiccamento spontaneo (o endogeno) viene definito come la chiusura delle palpebre che avviene involontariamente e senza stimolazione esterna, o meglio, senza stimolazione consciamente percepita, in quanto, anche se non notiamo lo stimolo, diversi fattori possono influenzare questo meccanismo e la sua frequenza, come l'umidità ambientale, la qualità dell'aria, la presenza di siccità, l'interesse nei confronti dello stimolo che si ha davanti (McMonnies, 2010), ma anche l'elaborazione visiva dello stimolo (Drew, 1951; Poulton e Gregory, 1952; Fogarty e Stern, 1989), i livelli di attenzione, la difficoltà del compito che si sta svolgendo (Hall, 1945; Holland e Tarlow, 1972; Stern et al., 1984; Stern et al., 1994) e la fatica, sia a livello visivo che generalizzata (Carpenter, 1984; Stern et al., 1994; McMonnies, 2010; Maffei e Angrilli, 2018).

Ogni tipo di ammiccamento è, quindi, regolato da meccanismi parzialmente diversi e rispecchia diversi processi ed eventi, e proprio per questo è importante che si facciano distinzioni nel

momento in cui si vuole studiare questo fenomeno; ad esempio, esistono alcune condizioni in cui ad un aumento del riflesso di ammiccamento è associata, in contemporanea, una diminuzione dell'ammiccamento spontaneo, come nel caso dell'infanzia o di persone con il morbo di Parkinson (Zametkin et al., 1979). L'ammiccamento oculare è un meccanismo estremamente interessante, che non si limita, quindi, a svolgere una semplice funzione fisiologica di “pulizia” dell'occhio e di mantenimento dello stato lubrificato della cornea, ma sembra invece correlato a diversi processi, non solo di tipo fisico, ma anche cognitivo ed emotivo. Effettivamente, per quanto, a causa dell'ampia variabilità, sia difficile calcolare una media precisa di ammiccamenti al minuto che rispecchi tutta la popolazione, si stima che nel corso di una giornata (nelle ore di veglia) una persona in media possa sbattere le palpebre circa 14.000 volte (Doughty, 2001); considerando che gli ammiccamenti necessari a mantenere integra la pellicola lacrimale non sono più di 3-4 al minuto (Al-Abdulmunem, 1999), possiamo notare come l'essere umano ammicchi molto più frequentemente di quanto sia necessario alla cornea per rimanere lubrificata. Dunque, l'utilità a livello fisiologico non può essere l'unica spiegazione che esiste dietro quest'azione, altri processi devono necessariamente esser coinvolti; per questo motivo, nel corso degli anni, l'interesse per questo indice è andato oltre alla sua funzione puramente fisiologica e molti studi si sono sempre più focalizzati su altri aspetti legati all'ammiccamento. Infatti, nonostante esista un'ampia variabilità di tecniche e metodologie usate, che a volte portano a risultati contrastanti e non omogenei, nell'ultimo secolo si sono accumulate sempre più evidenze riguardo i meccanismi che sottostanno al funzionamento dell'ammiccamento spontaneo, come anche prove delle correlazioni esistenti tra questo fenomeno e processi di tipo cognitivo ed emotivo.

1.2.1 Ammiccamento spontaneo come indice di stati cognitivi ed emotivi

Nel secolo scorso, la ricerca ha fatto enormi progressi nell'identificare come altri processi, oltre a quelli di tipo oftalmico e quelli relativi a input afferenti dalla cornea, potessero essere in grado di modificare l'ammiccamento spontaneo e si sono accumulate molte evidenze che mostrano come anche diversi stati cognitivi ed emotivi possano influire sull'andamento dell'ammiccamento. Ponder e Kennedy nel 1927 furono fra i primi a sviluppare l'ipotesi che l'ammiccamento potesse rappresentare qualcosa di più complesso di un semplice meccanismo fisiologico; l'idea prevalente fino ad allora vedeva, infatti, nell'ammiccamento un'unica funzione relativa alla pulizia e alla lubrificazione della cornea, mentre il loro studio dimostrò come questa spiegazione non fosse esaustiva. Ipotizzarono che l'influenza di fattori ambientali quali umidità o temperatura non fosse

sufficiente per spiegare l'esistenza e il funzionamento di quest'azione e che, quindi, altri meccanismi di controllo di tipo centrale dovessero essere coinvolti. Arrivarono alla conclusione che l'ammicciamento spontaneo fosse correlato con stati di tensione mentale della persona e che questi movimenti di ammicciamento potessero costituire dei meccanismi di rilascio dell'energia e della tensione. Successivamente, altri autori hanno ripreso questa ipotesi e sostenuto l'esistenza di un'influenza di tipo centrale e del fatto che questi movimenti possano rappresentare dei meccanismi di "sfogo" e "rilascio" di un accumulo di tensione interna. Le evidenze che sono state collezionate negli anni hanno dimostrato un quadro più complesso relativo alla relazione fra ammicciamento spontaneo e stati cognitivi ed emotivi, ma resta importante il contributo di queste prime ricerche nel realizzare che potessero esistere dei meccanismi di controllo a livello centrale.

Una serie di studi fatti nel corso degli anni ha dimostrato, ad esempio, come la frequenza di ammicciamento non sia fissa, ma vari in base alle condizioni sperimentali e, dunque, in base all'attività nella quale il soggetto è impegnato, con evidenze che riportano un incremento della frequenza nel corso di una conversazione e una diminuzione durante la lettura, rispetto a uno stato di quiete in cui il soggetto non è impegnato in nessuna attività (Ponder e Kennedy, 1927; Hall, 1945; Fogarty e Stern, 1989; Doughty, 2001). Nel caso della lettura ad alta voce, la frequenza di ammicciamento sembra seguire un pattern particolare, con gli ammiccamenti che non sono uniformemente distribuiti ma avvengono in dei momenti specifici, ossia in corrispondenza della punteggiatura (quando si prendono brevi pause per l'intonazione) e nei momenti in cui si gira pagina, quindi quando cambia la direzione dello sguardo (Hall, 1945). Anche durante una conversazione è stata indentificata una distribuzione di tipo non casuale, con dati che riportano come ogni individuo rimarchi il proprio discorso ammiccando tra e alla fine delle frasi che pronuncia (Holland e Tarlow, 1975). Il sognare ad occhi aperti (fenomeno associato a fissazione visiva), invece, sembra essere associato ad una bassa frequenza (Holland e Tarlow, 1975). Altri studi hanno identificato anche la natura del compito come un importante fattore che modula la frequenza d'ammicciamento, con decremento della stessa nel caso di compiti che coinvolgono elaborazioni di tipo visivo, come lettura o tracciamento visuo-motorio (Ponder e Kennedy, 1927; Poulton e Gregory, 1952), elaborazioni di tipo uditivo (Oh et al., 2012) o anche in base alla difficoltà del compito stesso (Drew, 1951; Holland e Tarlow, 1972; Bagley e Manelis, 1979). Esistono anche dati relativi all'ipotesi che stati di ansia o di eccitazione indotti sperimentalmente possano aumentare la frequenza di ammicciamento (Ponder e Kennedy, 1927) e questa ipotesi

risulta coerente con osservazioni che sono state fatte di persone chiamate a testimoniare nelle aule di tribunale. Un'ulteriore correlazione importante che è stata riscontrata è quella che lega un aumento della frequenza di ammiccamento ad un aumento della fatica mentale (Carpenter, 1984; Stern et al., 1994; Morris e Miller, 1996; McIntire et al., 2014; Maffei e Angrilli, 2018).

I risultati di questi studi e di molti altri hanno aiutato a svelare la natura complessa del fenomeno relativo all'ammicciamento oculare, un fenomeno che, quindi, non riflette l'influenza solo di fattori ambientali ma anche di processi cognitivi superiori, che vanno dall'elaborazione visiva di stimoli (Drew, 1951; Poulton e Gregory, 1952; Carpenter, 1984; Fogarty e Stern, 1989), al livello di carico cognitivo che un determinato compito richiede (Drew, 1951; Holland e Tarlow, 1972; Bagley e Manelis, 1979) fino allo stato emotivo esperito (Ponder e Kennedy, 1927).

Già nel 1951, Drew dimostrò, ad esempio, come la frequenza d'ammicciamento potesse essere un buon indice dell'accuratezza della performance visuo-motoria e, da quel momento, molte altre evidenze si sono aggiunte a conferma di ciò. La frequenza sembra, infatti, variare in modo inverso rispetto alla difficoltà del processo di elaborazione visiva che il compito richiede e alla quantità di controllo motorio necessario, diminuendo quando il compito richiede una più dettagliata elaborazione visiva in relazione ai movimenti; questo fenomeno è riscontrabile anche in situazioni più ecologiche come, ad esempio, nel caso di un guidatore che si trova nel traffico di città e presenta una frequenza minore rispetto a chi sta guidando in una strada di aperta campagna (Drew, 1951). Questo decremento significativo che la frequenza di ammicciamento mostra di fronte ad un compito di tipo visivo complesso può essere attribuito al tentativo dell'organismo di minimizzare la perdita di informazioni importanti (Fogarty e Stern, 1989); questa modulazione che avviene in relazione all'elaborazione visiva può essere, infatti, vista come un meccanismo adattivo, in quanto lo sbattere le palpebre causa una perdita temporanea di informazioni visive, dato che la palpebra crea una barriera tra l'occhio e lo stimolo da elaborare. A riprova di ciò, uno studio di Fogarty e Stern (1989) ha indagato la relazione esistente fra ammicciamento e saccadi, dimostrandone la co-occorrenza in compiti di riconoscimento e identificazione di stimoli visivi; è molto probabile, infatti, che l'ammicciamento avvenga simultaneamente ad un movimento saccadico e che la sua distribuzione sia influenzata anche dall'ampiezza di questi movimenti, con una maggior probabilità che avvengano ammiccamenti nel caso di saccadi più ampie. Questi dati sono coerenti con l'ipotesi della strategia adattiva, in quanto sarebbe ottimale per l'elaborazione visiva far

accadere insieme le due cose, in modo da ridurre al minimo la quantità di informazioni perse. L'ammicciamento spontaneo sembrerebbe, quindi, essere temporalmente organizzato in base ad aspetti dell'elaborazione visiva, e ciò fornisce sostegno all'idea che esso sia provocato da aspetti legati all'analisi delle informazioni e che, dunque, le latenze degli ammiccamenti possono essere usate come strumento utile ad indagare il livello di complessità di questo processo in un'ampia varietà di compiti (Fogarty e Stern, 1989).

Dagli anni '70 in poi hanno cominciato a essere pubblicati studi che mettono in relazione la frequenza d'ammicciamento con l'attività cognitiva, specialmente con processi relativi all'attenzione, anche nel caso di compiti in cui non è richiesta un'elaborazione di tipo visivo (Holland e Tarlow, 1972; Holland e Tarlow, 1975; Bagley e Manelis, 1979; Oh et al., 2012). Holland e Tarlow (1972, 1975), ad esempio, hanno dimostrato come durante un compito che richiede elaborazione cognitiva, la frequenza varia a seconda della difficoltà del task, anche nel caso di prove che richiedono di ricordare una sequenza di cifre oppure compiti di aritmetica da svolgere a mente; i dati raccolti hanno dimostrato come l'ammicciamento risulti inversamente correlato al carico cognitivo in modo sensibile, anche nel caso di compiti non visivi. In questa ricerca, però, i soggetti non erano consapevoli del fatto che gli autori stessero registrando la loro frequenza di ammicciamento e, quindi, nel 1979, Bagley e Manelis hanno riproposto uno studio simile, con compiti di aritmetica facili o difficili, dove, però, metà dei soggetti era consapevole della registrazione. Anche i dati di questo studio confermano la correlazione inversa tra frequenza di ammicciamento e carico cognitivo, riscontrando anche un effetto della consapevolezza che, in base ai loro risultati, sembra ridurre la frequenza generale dell'ammicciamento; in ogni caso, la frequenza varia in base alla difficoltà a prescindere dalla consapevolezza, comprovando come la frequenza di ammicciamento possa essere considerata un buon indicatore del carico cognitivo, con frequenze più basse che risultano associate a periodi di maggiore attenzione.

Si può dunque affermare con una certa sicurezza che una caratteristica comune di stati associati a una bassa frequenza di ammicciamento è la presenza di concentrazione a livello cognitivo e che l'ammicciamento è influenzato da variazioni del carico mentale. Un'ipotesi che possa spiegare questa relazione inversa considera come l'azione di ammicciamento potrebbe disturbare certi processi cognitivi e quindi essere inibita quando questi processi sono attivi; così, quando il carico mentale aumenta, l'inibizione dell'ammicciamento diventa un meccanismo adattivo che serve a

proteggere i processi cognitivi vulnerabili alle interferenze. Se effettivamente l'ammiccamento interferisse con determinati processi cognitivi, sarebbe ottimale che venisse organizzato in modo tale da accadere nelle finestre "vuote" tra un processo e l'altro, ma se il carico mentale aumenta, sono disponibili meno finestre e quindi si riduce l'opportunità di ammiccare senza disturbi (Holland e Tarlow, 1972).

Alcuni parametri relativi all'ammiccamento oculare (tra cui la frequenza e l'ampiezza) sono stati messi in relazione anche con quella che può essere definita fatica mentale, un costrutto caratterizzato da minore vigilanza, maggior distraibilità e più bassi livelli di attenzione (Stern et al., 1984). Sappiamo come l'attenzione sostenuta e la vigilanza declinino nel corso del tempo e una serie di studi ha fornito evidenze di come questo si rifletta anche in cambiamenti della frequenza di ammiccamento e di altri parametri relativi ai movimenti oculari (Carpenter, 1984; Stern et al., 1994; Morris e Miller, 1996; Caffier et al., 2003; McIntire et al., 2014; Maffei e Angrilli, 2018). In una revisione del 1994, Stern, Boyer e Schroeder hanno dimostrato l'esistenza dell'effetto *time-on-task* anche sulla frequenza di ammiccamento; questo effetto si riferisce al progressivo declino della performance e della vigilanza durante un compito cognitivo e le evidenze analizzate supportano l'esistenza di un aumento della frequenza di ammiccamento correlato all'aumento del tempo necessario per svolgere un compito. Nonostante l'influenza di molti altri fattori che abbiamo già considerato, le evidenze sono abbastanza robuste da poter permettere di affermare che la frequenza di ammiccamento risulta un indice efficiente di questo effetto e, quindi, della fatica mentale. Successive ricerche hanno fornito ulteriori evidenze a favore di questa affermazione; ad esempio, uno studio di Caffier, Erdmann e Ullsperger del 2003 ha diviso i partecipanti in due condizioni sperimentali, una condizione "assonnata" e una condizione "vigile", dimostrando come i partecipanti nella condizione assonata riportassero aumenti della durata degli ammiccamenti rispetto ai partecipanti nella condizione vigile, in un compito in cui era richiesto di fissare per 20 minuti un'immagine statica. Anche McIntire e collab. (2014) hanno dimostrato come la frequenza e la durata degli ammiccamenti varino significativamente nel tempo durante lo svolgimento di un compito di vigilanza. Dunque, sembrerebbe che con l'andamento e il peggioramento della performance, gli ammiccamenti aumentino e durino di più, il che può portare alla perdita di informazioni rilevanti. L'aumento della frequenza e della durata degli ammiccamenti è stato riscontrato non solo nel corso dello svolgimento di compiti monotoni, ma anche in situazioni più ecologiche di fatica, come in studi che hanno simulato condizioni di guida

di un camion (Haider e Rohmert, 1976) o di un aereo (Morris e Miller, 1996) per diverse ore. In quest'ultimo studio, gli autori hanno trovato come indice maggiormente correlato alla vigilanza l'ampiezza dell'ammicciamento, con un suo maggior aumento che corrisponde a un decremento nella vigilanza e a un aumento degli errori dovuti alla stanchezza, mentre la frequenza di ammicciamento è risultata il secondo miglior fattore predittivo di fatica. Tutti questi dati dimostrano come peggioramenti della performance avvengano a causa della fatica mentale e come i correlati fisiologici di questi peggioramenti possano essere misurati (Morris e Miller, 1996); da qui l'idea che informazioni sui parametri relativi all'ammicciamento possano essere un buon indicatore dei livelli di arousal di una persona e che possano fornire informazioni utili sull'attivazione del sistema nervoso centrale, oltre che sui livelli di fatica (McIntire et al., 2014). Ulteriori prove della bontà di questo indice nel rappresentare cambiamenti a livello della vigilanza derivano dalla ricerca di McIntire e collab. del 2014, nella quale è stato dimostrato che le metriche oculari registrate rispecchiano cambiamenti che avvengono a livello della velocità del flusso ematico neurale dell'emisfero destro; è già noto in letteratura, infatti, come i cali di attenzione siano correlati a un decremento della velocità del flusso ematico dell'emisfero destro e questo decremento correla con un aumento della frequenza degli ammiccamenti. Un altro contributo interessante deriva da uno studio del 2018 svolto da Maffei e Angrilli che ha utilizzato un compito di vigilanza (il Mackworth Clock Test) con tre diversi compiti di 7 minuti che rappresentavano diversi livelli di difficoltà, al fine di misurare la modulazione dell'ammicciamento spontaneo in relazione al crescente carico attentivo e indagare l'ipotesi che la frequenza di ammicciamento cambi in funzione della difficoltà e della durata del compito in modo indipendente oppure no (e che quindi le due variabili interagiscano fra loro). Una diminuzione della frequenza correla, anche qui, con lo svolgimento dei compiti più difficili, con un maggior numero di errori commessi e con tempi di risposta più veloci, mentre un aumento della frequenza (e quindi maggior fatica) è stato riscontrato già a partire dal 4° minuto di svolgimento della prova, indipendentemente dal livello di difficoltà. E' stata quindi provata l'esistenza di un effetto *time-on-task* anche dopo solo 4 minuti, dimostrando come la fatica possa emergere anche durante compiti brevi. Inoltre, se nell'analisi dell'andamento temporale della frequenza di ammicciamento gli effetti di difficoltà e fatica sono risultati indipendenti fra loro, è stata, invece, riscontrata un'interazione degli effetti nell'analisi *trial-by-trial*, ma solo nel caso del task di livello più difficile (e quindi nel caso di una maggiore richiesta di risorse attentive), nel quale è stata trovata un'inibizione dell'ammicciamento durante

tutta la prova, rispetto ai compiti di livello più facile, nei quali l'andamento rispecchiava l'aumento della fatica.

Stern, Boyer e Schroeder (1994) hanno preso in considerazione diverse ipotesi per spiegare la correlazione tra frequenza di ammiccamento e fatica mentale. Da un lato, c'è l'idea che esista una sorta di "quota fissa" di ammiccamenti da fare che va recuperata nel caso venga disturbata; da qui, l'aumento di ammiccamenti tipicamente riscontrato immediatamente dopo la fine di un compito durante il quale essi sono stati inibiti (Drew, 1951), quasi come se la variazione della frequenza di ammiccamento fosse raggiunta tramite cambiamenti nella distribuzione degli stessi, piuttosto che tramite un cambiamento della quantità di ammiccamenti in sé. La seconda ipotesi riprende, invece, l'idea di Karson (1983) che afferma che l'aumento sia dovuto a un maggior rilascio di dopamina nel sistema nervoso centrale. Gli autori sostengono anche una terza ipotesi che prende in considerazione l'idea che l'aumento della frequenza sia attribuibile ad una diminuzione del controllo inibitorio, di cui l'ammiccamento è solo uno dei tanti indici. Come abbiamo visto, gli ammiccamenti avvengono spesso in concomitanza con i movimenti saccadici e questo può essere visto come segno di un controllo inibitorio attivo che permette di ridurre al minimo le finestre di tempo in cui il flusso di informazioni in entrata è interrotto; nel momento in cui la fatica mentale prevale, però, è più difficile mantenere questo tipo di controllo attivo. Nel loro studio del 2018, Maffei e Angrilli propongono l'esistenza di una sorta di compromesso esistente tra la necessità fisiologica di mantenere l'omeostasi dell'occhio e le richieste ambientali di inibizione dell'ammiccamento nel caso dello svolgimento di determinate attività; l'effetto *time-on-task* potrebbe rappresentare un effetto di rimbalzo che ha lo scopo di restaurare l'attività tonica dopaminergica, a seguito di un iniziale investimento di risorse attentive. Nel caso dei diversi risultati trovati in base al livello di difficoltà, gli autori ipotizzano che nel compito di livello difficile (che richiede un maggior carico attentivo), il comportamento potrebbe essere guidato da processi bottom-up legati all'orientamento automatico dell'attenzione verso lo stimolo e che questo processo sia più resistente alla fatica, a differenza di processi legati ad un maggior controllo attentivo di tipo top-down; questo tipo di controllo, presente, invece, nei compiti più facili, porta ad una maggiore accuratezza ma essa viene pagata con tempi di risposta più lunghi e maggior fatica mentale. Riprendendo l'ipotesi di Karson (1983), la dopamina gioca effettivamente un ruolo importante in questi processi, che sono tutti mediati dal circuito-fronto-striatale dopaminergico. Questi risultati supporterebbero, dunque, l'idea che l'andamento della frequenza di ammiccamento

è un fenomeno che avviene quando le interazioni con l'ambiente richiedono un'allocazione attiva e controllata di risorse attentive e può riflettere l'equilibrio del tono centrale dopaminergico che è disturbato o interrotto nel caso di forte richiesta di attenzione (Maffei e Angrilli, 2018).

Un ulteriore aspetto d'interesse sono le numerose evidenze a favore di ampie differenze interindividuali a livello della frequenza di ammiccamento, probabilmente dovute sia a fattori ambientali che a variazioni fenotipiche. Queste differenze non sembrano influire nell'accuratezza della performance, in quanto non viene riscontrata nessuna differenza significativa tra ammiccatori "veloci" o "lenti" (Drew, 1951). I dati mostrano come un adulto, solitamente, presenta un pattern stabile di ammiccamenti, ma questo andamento non è costante nel corso di tutta la vita; infatti, l'ammiccamento spontaneo risulta assente alla nascita, con un aumento costante nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza fino al raggiungimento di un plateau intorno ai 14-15 anni, che viene poi mantenuto in età adulta (Zametkin et al., 1979). Dalla sua stabilizzazione in poi, infatti, la frequenza di ammiccamento non sembra variare in base all'età (in condizioni ambientali controllate), a dimostrazione di come le differenze interindividuali vengano mantenute nel corso della vita del singolo soggetto (Bentivoglio et al., 1997). L'ammiccamento spontaneo è stato individuato anche in bambini ciechi, con una frequenza uguale a quella dei normovedenti (Hall, 1945). Rispetto alle differenze nella performance cognitiva, ne sono state riscontrate tra uomini e donne in compiti di lettura, con le donne che presentano una media della frequenza quasi doppia rispetto agli uomini (Hall, 1945; Bentivoglio et al., 1997); d'altro canto, gli uomini sembrano in grado di sopprimere l'ammiccamento per più tempo e possono aumentarlo volontariamente in modo più veloce delle donne (Bentivoglio et al., 1997). Un altro fattore che impatta le differenze nella lettura probabilmente è relativo alle diverse capacità di lettura che ogni persona ha, con i lettori più bravi che riportano una media più elevata di ammiccamenti (Hall, 1945; Bentivoglio et al., 1997). Nessuna differenza significativa è stata, invece, riportata sulla base del colore degli occhi (Bentivoglio et al., 1997), a ulteriore conferma del fatto che la frequenza d'ammiccamento sia primariamente modulata da meccanismi centrali e da compiti cognitivi e che le condizioni oculari siano di limitata importanza.

1.2.2 Meccanismi centrali e circuiti neurali

La consapevolezza che l'ammiccamento spontaneo potesse essere un indice comportamentale in grado di rispecchiare diversi processi cognitivi è presente da molto tempo; già nel 1984, Stern,

Walrath e Goldstein sostenevano che l'attività di ammiccamento fosse sotto il controllo corticale e fosse quindi influenzata da fattori percettivi e psicologici, mentre nel 1995 Evinger propose l'ammiccamento come un ottimo modello di investigazione del controllo neurale del movimento e come marker di processi cognitivi di tipo superiore. Con lo sviluppo della ricerca e il potenziamento di tecniche non invasive di registrazione del segnale neurofisiologico, si è potuto indagare i meccanismi a livello centrale che sottostanno e che regolano l'ammiccamento spontaneo e si è giunti ad identificare l'attività dopaminergica come strettamente correlata all'azione di ammiccamento spontaneo. Da quando è stata postulata l'esistenza di questa relazione (Stevens, 1978) ad ora, abbiamo ormai accumulato molte evidenze che indicano come effettivamente la frequenza di ammiccamento spontaneo dipenda dall'attività dopaminergica del sistema nervoso centrale (Jongkees e Colzato, 2016), tanto che, ad oggi, possiamo considerare l'ammiccamento spontaneo come un marker indiretto, non invasivo e di facile utilizzo del funzionamento dopaminergico a livello centrale, in particolar modo a livello dell'attività fronto-striatale (Karson, 1983; Kaminer et al., 2011; Jongkees e Colzato, 2016; Maffei e Angrilli, 2018). La correlazione è di tipo positivo, con una frequenza maggiore che predice un più elevato funzionamento dopaminergico; nello specifico, la frequenza di ammiccamento spontaneo tende a correlare positivamente con l'attività dopaminergica a riposo, con evidenze che dimostrano che un'aumentata o ridotta attività dopaminergica a riposo (a causa di assunzione di droghe o di disturbi relativi a disfunzioni dopaminergiche) è associata rispettivamente a una maggiore o minore frequenza di ammiccamento (Jongkees e Colzato, 2016).

Le numerose evidenze rilevanti derivano principalmente da studi sperimentali con modelli animali che hanno utilizzato farmaci che modificano i livelli neurali della dopamina e da evidenze cliniche derivanti dall'osservazione di pazienti con malattie legate a una disfunzione dopaminergica. Karson (1983), ad esempio, ha portato avanti una serie di studi nei quali a delle scimmie rhesus venivano somministrati diversi agenti farmacologici che potevano essere agonisti o antagonisti dopaminergici, per osservarne, poi, l'effetto a livello dell'ammiccamento. I risultati hanno riportato un aumento significativo della frequenza nel caso della somministrazione di apomorfina (agonista dopaminergico), effetto che poteva essere bloccato se tre ore prima della somministrazione alle scimmie veniva data della sulpiride (antagonista dopaminergico). Queste evidenze sono a supporto dell'ipotesi che un aumento nell'attività dopaminergica porti a un aumento della frequenza di ammiccamento. Inoltre, la somministrazione diretta di dopamina (che

non è in grado di passare la barriera ematoencefalica) non ha causato nessuna modifica della frequenza di ammiccamento, ad indicare come quest'effetto sia modulato da cambiamenti dei livelli di dopamina a livello del sistema nervoso centrale.

Altre importanti evidenze derivano dalle osservazioni cliniche di pazienti con disturbi che implicano alterazione dell'attività dopaminergica: i due disturbi che hanno fornito evidenze più chiare sono il morbo di Parkinson e la schizofrenia (Hall, 1945; Stevens, 1978; Zametkin et al., 1979; Karson, 1983; Jongkees e Colzato, 2016), due patologie caratterizzate, fra le varie, anche da disfunzioni dell'attenzione (Nieoullon, 2002). La deplezione di dopamina nei pazienti parkinsoniani è stata collegata in letteratura al peggioramento della performance nei test neuropsicologici che testano l'attenzione e le funzioni esecutive, con risultati che dimostrano inflessibilità cognitiva e incapacità di spostare l'attenzione su informazioni rilevanti a completare il compito (Nieoullon, 2002). Nel caso di pazienti schizofrenici, gli eccessivi livelli di dopamina presenti a livello centrale sono stati correlati, invece, ad importanti problemi nell'orientamento dell'attenzione, probabilmente causati da un'incapacità di evitare l'elaborazione di informazioni non rilevanti (Nieoullon, 2002). I dati relativi ai pazienti con il morbo di Parkinson hanno dimostrato una frequenza di ammiccamento spontaneo diminuita in questi pazienti (Hall, 1945; Zametkin et al., 1979; Karson, 1983), dato coerente con la diminuita attività centrale dopaminergica causata dalla deplezione della dopamina a livello del circuito nigrostriatale; inoltre, pazienti che presentano discinesia causata da trattamenti con la levodopa (che aumenta i livelli di dopamina centrali) hanno una media di ammiccamenti al minuto doppia rispetto a quella di altri pazienti con Parkinson, mentre pazienti senza discinesia e più sintomatici hanno frequenze molto basse, fino a 3 ammiccamenti circa al minuto (Karson, 1983). Il maggior decremento registrato in pazienti più gravi può essere indicativo di come il deficit dell'attività centrale della dopamina sia parallelo alla gravità di altre manifestazioni sintomatiche del Parkinson. Le evidenze sulla schizofrenia sono di tipo inverso, invece: infatti questi pazienti presentano una media molto alta della frequenza di ammiccamento rispetto ai controlli sani e ad altri pazienti psichiatrici, una media che arriva fino ai circa 30 battiti al minuto e che viene normalizzata con trattamenti a base di neurolettici, che sono degli antagonisti dopaminergici (Karson, 1983). Anche questo dato risulta coerente, considerando che la schizofrenia è caratterizzata da un eccesso di dopamina a livello del sistema mesocorticolimbico. Zametkin, Stevens e Pittman (1979) hanno dimostrato come esista una relazione inversa tra ammiccamento spontaneo e abituazione al riflesso glabellare (parte del

riflesso di ammiccamento) in questi disordini della trasmissione dopaminergica, relazione inversa simile a quella riscontrata durante l'infanzia (con minor numero di ammiccamenti spontanei e minor capacità di abituazione al riflesso glabellare) e hanno suggerito come questi due aspetti legati ai movimenti oculari possano riflettere la maturazione e l'integrità di circuiti neurali dopaminergici.

Tutti questi dati sono consistenti con l'ipotesi che la frequenza di ammiccamento sia correlata con le capacità attentive, in una relazione inversa che vede una diminuzione della frequenza ogniqualvolta sia richiesto uno sforzo maggiore; sappiamo, infatti, che squilibri nell'attività dopaminergica possono andare a compromettere diversi processi cognitivi, fra i quali i processi attentivi, in quanto l'attenzione è modulata da molti neurotrasmettitori, inclusa la dopamina e, dunque, un suo malfunzionamento può rispecchiarsi in questa tipologia di problematiche (Maffei e Angrilli, 2018). Queste evidenze supportano l'ipotesi che la frequenza di ammiccamento possa essere un indice non invasivo e di facile utilizzo della componente dopaminergica dell'attenzione e un utile fattore predittivo del funzionamento dopaminergico in vari contesti.

Nello specifico, da una revisione fatta da Jongkees e Colzato nel 2016 è emerso che la frequenza di ammiccamento sembra riflettere l'attività sia del recettore D1 che D2 della dopamina (anche se in una situazione di baseline sembra maggiormente correlato ai recettori D2) e che le evidenze a favore della correlazione sono robuste, in quanto questo indice è risultato efficiente nel predire ipo- e iperattività dopaminergica nei pazienti, come anche la normalizzazione della stessa in seguito a trattamenti farmacologici. Un ulteriore aspetto interessante riguarda la potenzialità di questo indice fisiologico nel predire le differenze individuali nella performance cognitiva in diversi tipi di compiti, specialmente quelli relativi a un comportamento di ricompensa e alla flessibilità cognitiva.

Dunque, l'ammiccamento spontaneo sembra derivare dall'attività di un generatore interno (Ponder e Kennedy, 1927; Stern et al., 1984) che è modulato dalle afferenze della cornea, dall'attività dopaminergica e dagli stati cognitivi. Sono numerose le evidenze a favore dell'esistenza di una correlazione tra attività dopaminergica e l'azione di ammiccamento spontaneo ma per quanto riguarda le proprietà del circuito centrale interno che sottostà al suo funzionamento e la sua localizzazione precisa, esse non sono ancora del tutto chiare. Proprio allo scopo di poter studiare nel dettaglio come i processi cognitivi e alcune malattie modifichino l'ammiccamento spontaneo,

sarebbe importante sviluppare un modello animale di mammifero per provare ad identificare i circuiti neurali responsabili della sua generazione: i ratti sono un ottimo candidato, in quanto abbiamo già prove di come le caratteristiche del riflesso di ammiccamento nei ratti e nell'uomo siano simili a livello qualitativo e la modulazione di questo riflesso da parte dei gangli della base è identica in primati e ratti (Kaminer et al., 2011). Basandosi proprio su un modello di ratti, uno studio del 2011 (Kaminer et al., 2011) ha identificato il complesso spinale del trigemino come struttura con un ruolo chiave all'interno di quello che può essere considerato "il generatore centrale dell'ammiccamento spontaneo"; l'ipotesi attualmente più accreditata prevede che i livelli di dopamina nei gangli della base siano in grado di modificare la frequenza e l'ampiezza dell'ammiccamento spontaneo attraverso l'inibizione del collicolo superiore, che a sua volta porta all'eccitazione del nucleus raphe magnus, che a sua volta inibisce il complesso spinale del trigemino (Basso e Evinger, 1996). Un altro attore importante nel controllo neurale dell'ammiccamento sono le regioni frontali, in particolar modo il giro mediale destro, il quale sembra esser coinvolto in modo specifico nella generazione dell'ammiccamento spontaneo, a differenza di aree come il giro paraippocampale e la corteccia occipitale (visiva) che sono coinvolte nella modulazione dell'ammiccamento spontaneo ma anche di quello volontario (Hyo et al., 2005). Questi dati supportano l'idea che una diminuzione dell'attività dopaminergica possa essere mediata da un'influenza top-down da parte della corteccia prefrontale, la quale è direttamente coinvolta in processi attentivi (Maffei e Angrilli, 2018).

1.2.3 Tecniche di registrazione del segnale

Le tecniche normalmente impiegate per l'analisi dell'ammiccamento oculare e della sua frequenza possono essere di diverso tipo, ma quelle utilizzate più comunemente sono l'elettroencefalografia (EEG), l'elettrooculografia verticale (vEOG), sistemi di eye-tracking e sistemi che utilizzano videocamere per poi andare a ricavare dalle registrazioni i dati relativi ai movimenti oculari che si vogliono analizzare (Martins e Carvalho, 2015). Nel secolo scorso erano comuni anche altre tecniche che sono state man mano sostituite da tecniche più recenti, più rapide e meno invasive: per citarne alcune, il movimento di apertura e chiusura della palpebra poteva essere registrato tramite l'utilizzo di una stringa attaccata alla palpebra stessa e un potenziometro oppure potevano essere usati dei sistemi di leva e dei sistemi di specchi riflettenti per trasdurre meccanicamente o otticamente il movimento della palpebra, oppure ancora delle tecniche fotoelettriche che sfruttavano il riflesso della sclera o di altre parti dell'occhio e che riconoscevano la chiusura

dell'occhio perché in quel caso non c'era riflesso (Stern et al., 1984). Molto popolari erano anche le tecniche fotografiche o videografiche, anche se, richiedendo delle procedure di astrazione dei dati abbastanza impegnative, il loro uso sta diminuendo sempre di più, a favore di tecniche di più facile utilizzo (Stern et al., 1984). Anche l'elettromiografia (EMG) può essere utilizzata: essa è una tecnica molto utile per analizzare diverse attività che avvengono a livello del volto, in quanto in esso sono presenti un elevato numero di muscoli che contribuiscono alle attività e alle espressioni facciali e, nel caso della registrazione dell'ammicciamento, viene sfruttata l'attività dei muscoli responsabili della chiusura della palpebra, ossia i muscoli orbicolari dell'occhio (Stern et al., 1984).

L'eye-tracking, invece, è una tecnica che si è sviluppata nel corso degli anni e che ha permesso di registrare parametri relativi ai movimenti oculari e alla direzione dello sguardo in modo molto più economico, rapido e non invasivo rispetto a metodologie usate negli anni passati, che rappresentavano a volte anche una barriera per molti ricercatori, in quanto tecniche costose e dispendiose in termini di tempo ed energie, oltre che invasive per i partecipanti. Al giorno d'oggi, eyetracker basati su registrazioni video possono determinare la direzione dello sguardo, ad esempio, con un alto grado di accuratezza, misurando la posizione del riflesso della cornea tramite l'utilizzo di sistemi a luce infrarossa. La maggior parte degli eyetracker moderni raccolgono i propri dati sui movimenti oculari dalle immagini/video registrati di volto e occhi, tramite l'invio di una fonte di luce verso l'occhio (solitamente una luce infrarossa che è invisibile all'occhio umano) che produce un riflesso della cornea che viene identificato dal software; anche il centro della pupilla è identificato dall'eyetracker. A seguito di una calibrazione sul singolo soggetto, a partire dalla posizione relativa della pupilla e del riflesso della cornea, il software può stabilire con molta accuratezza la direzione dello sguardo (Carter e Luke, 2020), come anche i movimenti oculari quali saccadi, fissazioni e ammiccamenti.

Attualmente, una delle tecniche più utilizzate, in quanto tecnica meno costosa, rapida, non invasiva e di facile utilizzo, risulta essere l'elettrooculografia verticale (vEOG), la quale misura la differenza di potenziale esistente tra la cornea (che ha carica positiva) e la retina o il fondo oculare (che ha carica negativa), ossia fra la parte anteriore e posteriore del bulbo oculare (Stern et al., 1984). In particolare, l'EOG si basa sulla registrazione indiretta della differenza fra il potenziale delle cellule visive retiniche (che si trasmette alla sclera e ai tessuti orbitari) ed il potenziale delle

fibre ottiche che si trasmette alla cornea (Creel, 2019). Questa tecnica sfrutta l'utilizzo di due elettrodi posti al di sopra e al di sotto dell'occhio per registrare il movimento della palpebra superiore sulla cornea che avviene durante l'ammiccamento, quando si chiudono gli occhi e quando lo sguardo si sposta dalla porzione alta a quella bassa del campo visivo; la palpebra agisce, in questo caso, come una resistenza scorrevole, alterando il potenziale di base esistente tra cornea e fondo oculare. La cornea è, infatti, carica positivamente rispetto al fondo oculare e il movimento della palpebra su di essa è associato ad un aumento della positività della carica, mentre quando la palpebra si ritrae aumenta la negatività della carica associata alla cornea (Matsuo et al., 1975). Se si usa l'elettrooculografia con lo scopo di identificare la posizione dell'occhio nel piano verticale, quanto appena descritto risulta in un artefatto, ma smette di esserlo, invece, se si è interessati alla registrazione dei movimenti delle palpebre. Stern, Walrath e Goldstein (1984) hanno voluto testare questa tecnica, per assicurarsi che rispecchiasse in modo fedele l'effettiva posizione delle palpebre e per farlo hanno utilizzato l'elettrooculografia in contemporanea ad una videoregistrazione che riprendesse sia i movimenti dell'occhio che il poligrafo che stava segnando il tracciato dell'elettrooculogramma; i dati registrati hanno confermato che la chiusura delle palpebre è chiaramente associata a cambiamenti nel potenziale dell'elettrooculografia verticale, dando ulteriore sostegno alla validità e all'utilità di questa tecnica nella registrazione di parametri relativi all'ammiccamento oculare.

1.2.4 Possibili ambiti di utilizzo

Sviluppare un metodo di facile utilizzo, comodo e non invasivo che permetta di rilevare l'ammiccamento oculare in ambienti ecologici potrebbe essere molto utile in diversi ambiti: ad esempio, si potrebbe sfruttare questo indice fisiologico per monitorare l'attenzione sostenuta e la vigilanza in alcuni ambienti lavorativi particolari, come nel caso dei settori che operano nell'ambito della sicurezza pubblica, lavori che tendono ad avere una natura monotona o che richiedono ritmi molto sostenuti, come nel caso di procedure medico-chirurgiche o di chi deve percorrere lunghe tratte guidando (McIntire et al., 2014; Martins e Carvahlo, 2015; Daza et al., 2020). Come abbiamo visto, infatti, studi che correlano la frequenza di ammiccamento con attività cognitive come l'attenzione (Holland e Tarlow, 1972; Bagley e Manelis, 1979; Maffei e Angrilli, 2018) suggeriscono che le frequenze più basse sono associate a periodi di maggiore attenzione, mentre frequenze più alte correlano con momenti di calo dell'attenzione. Sappiamo che l'attenzione e la vigilanza tendono a declinare nel corso del tempo, e quindi sarebbe

particolarmente importante e nell'interesse delle varie organizzazioni avere uno strumento che permetta di monitorare l'andamento della fatica in questa tipologia di lavori, così da poter contare su sistemi di controllo e monitoraggio degli operatori e rendere gli ambienti lavorativi sicuri ed efficienti (Martins e Carvahlo, 2015). Un sistema di questo tipo, come ad esempio un eye-tracker che restituisce in tempo reale le metriche relative ai parametri oculari, potrebbe essere implementato come misura preventiva che fornisce segnali di avviso nel caso registri dati relativi alla fatica e alla stanchezza, così da poter evitare conseguenze pericolose causate da cali dell'attenzione (McIntire et al., 2014). Questo indice potrebbe anche essere utilizzato nel caso di sistemi che rilevano la menzogna (*lie detector*) o come *anti-spoofing* per il volto.

Data la correlazione esistente tra ammiccamento spontaneo e attività dopaminergica, questo indice può essere estremamente utile anche da un punto di vista clinico: può essere utilizzato per analizzare l'andamento di condizioni neuropsichiatriche e neurologiche (Ebert et al., 1996; Barbato et al., 2012; Ladas et al., 2014), come anche la risposta dei pazienti ai trattamenti e l'effetto che essi hanno sulla normalizzazione dei livelli dopaminergici. Può essere utilizzato anche per studiare l'effetto delle droghe sul funzionamento della dopamina. Registrare l'ammiccamento spontaneo può rivelarsi un ottimo strumento anche per l'analisi del comportamento e della personalità in popolazioni di persone sane (Müller et al., 2007; Chermahini e Hommel, 2010), nelle quali può permettere di monitorare lo stato funzionale della dopamina e anche indagare gli effetti delle differenze interindividuali del funzionamento dopaminergico a livello della performance cognitiva (Jongkees e Colzato, 2016).

I potenziali campi di applicazione per questo indice fisiologico sono numerosi e dai risvolti importanti, come anche le ricerche che hanno indagato il ruolo e i meccanismi ad esso sottostanti; non vanno ignorate, però, le problematiche, in quanto spesso risulta difficile comparare i vari studi esistenti fra loro e giungere a una conclusione univoca, in quanto esistono differenze fra gli studi legate alle condizioni sperimentali, alle variabili confondenti a volte non prese in considerazione e alle diverse metodologie usate (Jongkees e Colzato, 2016). E', dunque, necessaria una ricerca più sistematica e omologata fra i diversi studi, così che si possano superare le difficoltà relative alle differenze e comparare fra loro i vari risultati, in modo da giungere a conclusioni più solide e omogenee.

1.3 La caffeina

La caffeina è la sostanza psicoattiva di maggior consumo mondiale e uno degli stimolanti più utilizzati nello sport per la sua efficacia e sicurezza. Negli Stati Uniti più dell'80% della popolazione adulta ne fa uso quotidianamente, stessa percentuale di consumo che si riscontra in molti dei paesi europei (Barone e Roberts, 1996). E' un alcaloide naturale, ampiamente presente in natura, e ha una lunga storia di consumo, tanto che si ritiene potesse essere consumata, in una forma o in un'altra, già dal Paleolitico. La sostanza è stata isolata chimicamente dai chicchi del caffè già nel 1820 e attualmente conosciamo più di 60 specie di piante che contengono caffeina (Barone e Roberts, 1996). La caffeina si può trovare nel caffè, nel tè, nelle bevande a base di cola, nel cacao, nei gelati al cioccolato, nei cioccolatini, e anche in alcuni farmaci da banco (OTC), solitamente quelli utilizzati per mantenere o stimolare uno stato di veglia o nei farmaci soppressori dell'appetito (Julien et al., 2011).

Mediamente una tazza di caffè contiene tra gli 80 e i 100 mg di caffeina (3 mg per il decaffeinato), una bottiglietta di coca cola ne contiene circa 40 mg e nella cioccolata si può arrivare a un massimo di 88 mg per 100 g di prodotto (Julien et al., 2011). Ovviamente il contenuto di caffeina è molto variabile, e vanno quindi tenuti in considerazione diversi fattori quali la tipologia di prodotto che si consuma (espresso piuttosto che americano), la diversa concentrazione di caffeina che prodotti di marche diverse possono presentare, la varietà di piante da cui deriva e i metodi di preparazione; in ogni caso, il caffè ha il più alto e più vario contenuto di caffeina tra i prodotti alimentari. Il consumo medio giornaliero è di 200-550 mg (2-5 espressi); negli adulti, l'assunzione di caffeina avviene principalmente tramite caffè e tè, mentre per bambini e adolescenti viene assunta tramite bevande energetiche e cioccolata (Nawrot et al., 2003).

Non ci sono restrizioni per la vendita e per il consumo, né viene considerato abuso il consumo abituale, ma è comunque necessaria della cautela, soprattutto per quanto riguarda le popolari bevande energetiche, nelle quali sono presenti grandi quantità di caffeina, che potrebbero diventare pericolose per la salute di chi le utilizza (Julien et al., 2011). Per adulti in salute, un'assunzione moderata giornaliera fino a 400 mg non è associata a effetti negativi come tossicità, effetti cardiovascolari, cambiamenti gravi del comportamento o aumenti di cancro. La quantità massima raccomandata cambia, invece, per soggetti sensibili quali donne incinte o bambini, con linee guida

che suggeriscono di non superare i 300 mg giornalieri per le donne in gravidanza e i 2.5 g per i bambini (Nawrot et al., 2003).

1.3.1 Farmacocinetica

La caffeina è una metilxantina (1,3,7-trimethylxantina), famiglia di sostanze nota per l'effetto stimolante. Assunta per via orale, è rapidamente assorbita dal tratto gastrointestinale e raggiunge il picco a livello ematico in circa 30-45 minuti; è assorbita completamente in un massimo di 90 minuti, mentre si arriva al massimo livello plasmatico in circa 2 ore, dopodiché la concentrazione di caffeina nel sangue comincia a declinare (Julien et al., 2011). Essendo molto solubile, si distribuisce liberamente e in maniera uniforme in tutti i liquidi corporei e arriva ad avere concentrazioni simili in tutte le parti dell'organismo; attraversa facilmente la barriera ematoencefalica, la placenta, passa nel latte materno ed è stata riscontrata anche nello sperma (Nawrot et al., 2003). La caffeina, dunque, entra velocemente in tutti i tessuti corporei, compreso il cervello, il che spiegherebbe la rapida comparsa degli effetti psicologici dopo che si beve una tazzina di caffè. Il fegato metabolizza quasi tutta la caffeina, che viene poi secreta a livello renale, mentre solo il 10% è escreta immodificata (Julien et al., 2011). Durante il processo di metabolizzazione, come prima cosa la caffeina viene demetilata in dimetilxantine, di cui fa parte il suo metabolita primario, la paraxantina, e altri suoi metaboliti rilevanti quali la teofillina e la teobromina; queste dimetilxantine sono farmacologicamente attive e contribuiscono agli effetti che la caffeina esercita sul nostro corpo. L'emivita della caffeina va mediamente dalle 4 alle 6 ore, con un'ampia variabilità che può spaziare fra le 2 e le 12 ore in un adulto sano (Benowitz, 1990); questo perché la velocità del metabolismo della caffeina è molto variabile, con differenze che dipendono sia da fattori ambientali che genetici. Ad esempio, l'emivita è maggiore in persone con malattie croniche del fegato, nelle donne incinte, nelle persone anziane e nei bambini, mentre si dimezza nel caso dei fumatori. Durante la gravidanza, l'emivita aumenta da 4 ore nel primo trimestre fino ad un massimo di 15 nell'ultimo (van Dam et al., 2020). Nei neonati, invece, il metabolismo è molto lento, con un'emivita che può arrivare fino a 100 ore; i neonati, inoltre, non sono in grado di demetilare la caffeina fino a tre mesi di età, e quindi la sostanza viene eliminata non modificata quasi esclusivamente tramite i reni. Già intorno ai 5-6 mesi, però, il metabolismo della caffeina sembra stabilizzarsi e raggiungere un funzionamento simile a quello di un adulto (Benowitz, 1990; Nawrot et al., 2003). Il fumo di tabacco, invece, accelera il metabolismo della caffeina, e per questo smettere può portare a un aumento delle concentrazioni nel sangue del 200%,

contribuendo così ai sintomi da astinenza da tabacco nei forti bevitori di caffè (soprattutto perché la caffeina può indurre o intensificare gli stati di ansia come quelli di panico). Coerentemente con un'emivita di 4-6 ore, i livelli plasmatici della caffeina aumentano nel tempo in persone che bevono caffè durante la giornata, raggiungendo un plateau nel pomeriggio o nel tardo pomeriggio, e nella maggior parte delle persone è eliminata dal corpo durante la notte, anche se alcuni suoi metaboliti hanno un'emivita più lunga e restano più a lungo nel sangue. Nel caso di un ridotto metabolismo per la sostanza, però, (e quindi un'emivita molto lunga) i livelli plasmatici della caffeina aumentano e questo sembrerebbe poter giustificare la veglia notturna in alcune persone (Benowitz, 1990; Julien et al., 2011; Nawrot et al., 2003).

1.3.2 Farmacodinamica

La caffeina è metabolizzata principalmente dal sottogruppo di enzimi metabolici epatici CYP-1A2, enzimi che fanno parte della famiglia del citocromo P450 e che sono responsabili di gran parte del metabolismo epatico dei farmaci; nel caso della caffeina, ad esempio, l'attività di questo enzima si occupa di circa il 95% del suo metabolismo primario, azione che dà origine al metabolita primario paraxantina, come anche alla teobromina e alla teofillina (Higdon e Frei, 2006). Proprio a causa dell'ampia variabilità fra individui nella capacità di metabolizzare la caffeina, si è ipotizzata l'esistenza di due categorie di metabolizzatori, i metabolizzatori "lenti" e quelli "rapidi". Una ricerca di Cornelis e collab. (2006) ha tentato di analizzare proprio questa variabilità presente nella popolazione e ha identificato la base genetica di questa differenza di metabolismo nelle differenze isoenzimatiche proprio del sistema CYP-1A2. Quest'ipotesi è supportata da altre evidenze che, prese nel loro insieme, sembrano dunque dimostrare che l'attività degli enzimi che metabolizzano la caffeina e le metilxantine possa essere in parte ereditaria e che una variante del gene che codifica per CYP-1A2 sia associata a livelli plasmatici di caffeina maggiori e a un minor rapporto paraxantina/caffeina (che riflette il metabolismo più lento) come anche ad una minor assunzione della sostanza; le osservazioni e i dati sperimentali sembrano, infatti, dimostrare una minor tendenza nel consumo di caffeina da parte delle persone che posseggono questa variante (van Dam et al., 2020). Come già sostenuto, comunque, il metabolismo della caffeina e di altre sostanze può essere influenzato da diversi fattori, interni o esterni, fra i quali l'età, il sesso, lo stato nutrizionale, l'attività fisica, ma anche fattori sociali e culturali quali il comportamento dei pari. Quindi, sono possibili interazioni fra i fattori genetici ed ambientali: ad esempio, persone che presentano la variante del gene che li rende "metabolizzatori lenti" sotto i 50 anni che consumano

grandi quantità quotidiane di caffè risultano essere più predisposti all'infarto miocardico (Julien et al., 2011).

Gli enzimi CYP-1A2 sono importanti nel metabolismo della caffeina, ma non solo, in quanto sono coinvolti nel metabolismo di diversi farmaci, e per questo motivo la caffeina è suscettibile a diverse interazioni farmacocinetiche con altre sostanze. Da un lato, farmaci che inibiscono l'attività di CYP-1A2 interferiscono con il metabolismo e l'eliminazione della caffeina, aumentandone il rischio di effetti tossici; due esempi di sostanze di uso comune che inibiscono il metabolismo di questi enzimi sono l'alcool e gli estrogeni contenuti nelle pillole contraccettive. Ci sono dati esistenti, ad esempio, che dimostrano come l'emivita in una donna che assume contraccettivi orali sia quasi doppia rispetto a una donna della stessa età in ovulazione (Nawrot et al., 2003). Anche alcuni tipi di farmaci interferiscono con il metabolismo della caffeina, tra cui alcuni farmaci usati per problematiche cardiovascolari, farmaci broncodilatatori e alcuni psicofarmaci, in particolar modo alcuni tipi di antidepressivi, come gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI); per questo motivo, pazienti che assumono questo tipo di farmaci sono suscettibili ad un'elevata tossicità o intolleranza alla caffeina e possono arrivare a sviluppare il caffeinismo e forte ansia se i livelli plasmatici della caffeina aumentano eccessivamente (Julien et al., 2011). D'altro canto, il consumo abituale di caffeina aumenta l'attività dell'enzima CYP-1A2, il che ha implicazioni per il metabolismo di diversi farmaci: la caffeina, e le metilxantine in generale, possono aumentare sia gli effetti voluti che quelli collaterali di agenti β -adrenergici come l'epinefrina, hanno il potenziale di aumentare il rischio di ipertensione in individui che assumono inibitori delle monoamino ossidasi (MAO) e potrebbero inibire il metabolismo epatico dell'antipsicotico clozapina, aumentandone i livelli plasmatici e il rischio di tossicità. In ogni caso, questo tipo di interferenze che le metilxantine possono causare non hanno sempre risvolti negativi; la caffeina, infatti, sembra anche diminuire l'eliminazione sistemica del paracetamolo e aumentare la biodisponibilità dell'aspirina, il che spiegherebbe l'efficacia analgesica di questa sostanza quando aggiunta a farmaci analgesici (Higdon e Frei, 2006).

1.3.3 Effetti farmacologici

La caffeina ha effetti stimolanti sul sistema nervoso centrale, oltre che a livello cardiaco, respiratorio e diuretico, e proprio per questo, è utilizzata per trattare alcune patologie come la narcolessia, l'emicrania, l'asma e l'apnea nei neonati; viene anche aggiunta ad alcuni analgesici

per trattare cefalee o altri sindromi dolorose. Essendo un efficace psicostimolante, viene, inoltre, assunta per ottenere una maggiore vigilanza e capacità di fare (o per raggiungere il cosiddetto “stato di appagamento”). Gli effetti della caffeina possono essere facilmente riscontrati a livello comportamentale: ad esempio, in seguito all’assunzione di basse dosi (1 o 2 tazze di caffè americano), si può riscontrare nella persona una sensazione di fatica ridotta, minore necessità di dormire, aumento della vigilanza mentale, flusso di pensieri più veloce e chiaro e mantenimento prolungato di uno stato di veglia. L’aumento della consapevolezza può favorire uno sforzo intellettuale sostenuto per tempi prolungati senza la compromissione del coordinamento dell’attività mentale e motoria, anche se alcuni compiti di tipo cognitivo-motorio possono essere influenzati negativamente, come compiti che richiedono coordinazione muscolare fine, le abilità aritmetiche e la valutazione accurata del tempo (Harland, 2000; Julien et al., 2011). Minori tempi di reazione in alcuni tipi di compiti e un potenziamento dell’elaborazione di informazioni nuove sono ulteriori effetti riscontrati in seguito al consumo di caffeina, come anche un leggero miglioramento dell’umore (Smith et al., 2005). Tutti questi effetti stimolanti esercitati dalla caffeina risultano più marcati nel caso di situazioni a basso arousal o situazioni di fatica, come nel caso di persone private dal sonno, rispetto a condizioni in cui le persone sono vigili e attive; ciò non vuol dire, però, che nel caso di soggetti non affaticati e non compromessi in alcun modo, la caffeina non abbia nessuna influenza, infatti è stato dimostrato come essa eserciti comunque degli effetti che migliorano la performance, anche se di minore entità (Smith et al., 2003; Smith et al., 2005). Gli effetti della caffeina sembrano essere modulati anche dalle caratteristiche dei compiti e della performance cognitiva richiesta; ad esempio, esistono evidenze di una più marcata influenza della sostanza nel caso di compiti che richiedono vigilanza e di compiti semplici che richiedono una risposta sostenuta nel tempo, rispetto a compiti più difficili, per i quali è più complesso stimarne gli effetti, in quanto sono compiti che probabilmente coinvolgono interazioni tra la caffeina e altre variabili che aumentano la vigilanza (come la personalità o il momento della giornata) (Smith et al., 2002). Dunque, possiamo sostenere con un buon margine di sicurezza che la caffeina esercita effetti stimolanti a livello comportamentale e della performance cognitiva, ma questi effetti non sono assoluti e sono mediati da diversi fattori inerenti allo stato di affaticamento della persona e al tipo di compito che viene richiesto di svolgere.

Questi effetti stimolanti della caffeina (e delle metilxantine in generale) sembrerebbero associati a cambiamenti nel metabolismo energetico neurale a livello locale; diversi studi hanno riportato,

infatti, un aumento significativo del glucosio utilizzato da alcune aree specifiche in seguito alla somministrazione di caffeina: si tratta di aree quali i gruppi cellulari monoaminergici, la substantia nigra e l'area tegmentale ventrale (aree ricche di recettori dopaminergici), i nuclei del rafe mediali e dorsali (da dove originano le proiezioni serotoninergiche) e il locus coeruleus (da cui partono le proiezioni noradrenergiche), ma anche strutture extrapiramidali del sistema motorio, diversi nuclei talamici e centri motori o limbici (Nehlig et al., 1992). Questi aumenti locali nel consumo di glucosio in strutture neurali coinvolte nel controllo dell'attività locomotoria e, soprattutto, nella regolazione del ciclo sonno/veglia correlano con le modificazioni comportamentali normalmente osservate in seguito all'assunzione di caffeina. Un aspetto interessante è, inoltre, il fatto che il metabolismo neurale non sembrerebbe sviluppare tolleranza agli effetti della caffeina. Le metilxantine hanno, comunque, un duplice effetto a livello neurale: oltre ad aumentare il metabolismo locale di alcune aree, esse aumentano anche la resistenza cerebrovascolare, il che ha un effetto vasocostrittore e porta a una riduzione del flusso sanguigno cerebrale di circa il 30%; quest'azione riduce la pressione nell'encefalo ed è alla base dell'effetto benefico che la caffeina ha nel trattare le cefalee, soprattutto le emicranie. La riduzione del flusso sanguigno, inoltre, risulta maggiore proprio nelle aree dove viene registrato un aumento del metabolismo; questa duplice azione delle metilxantine appare contraddittoria, perché di solito flusso ematico cerebrale e metabolismo energetico neurale sono positivamente correlati. I dati sembrano dimostrare, però, come la caffeina sia in grado di indurre ipoperfusione cerebrale accompagnata dal simultaneo aumento del consumo di glucosio, come se modificasse i meccanismi regolatori alla base della relazione tra flusso cerebrale e metabolismo. Il perché questo accada non è chiaro, ma un'ipotesi probabile è quella relativa agli effetti di antagonismo della caffeina rispetto all'adenosina, i quali potrebbero disturbare il meccanismo di modulazione normalmente esercitato dall'adenosina, che regola la relazione tra flusso ematico e metabolismo nel sistema nervoso centrale (Nehlig et al., 1992).

La caffeina esercita effetti significativi anche al di fuori del sistema nervoso centrale, in particolar modo sul sistema cardiovascolare: un effetto tipico implica una debole azione stimolante del cuore, agendo in modo tale da aumentare sia la gittata cardiaca che la contrattilità. Un altro effetto molto studiato riguarda l'aumento acuto della pressione sanguigna, soprattutto nel caso di soggetti predisposti all'ipertensione, oltre che un aumento del livello di catecolamine in circolazione. Se è vero che queste azioni prese singolarmente potrebbero predisporre all'ipertensione, è anche vero

che la caffeina causa dilatazione delle arterie coronarie, fornendo in questo modo una maggior quantità di ossigeno al cuore sovraccaricato di lavoro, così da “compensare” gli effetti ipertensivi (Julien et al., 2011). I meccanismi alla base delle interazioni tra caffeina e sistema cardiovascolare sono, comunque, molto complessi e questo causa delle controversie a livello di interpretazione dei risultati; in ogni caso, un buon numero di ricerche sostengono che gli effetti avversi della caffeina sul sistema cardiovascolare potrebbero derivare non necessariamente dall’azione della sostanza in sé, ma piuttosto dall’azione di altre componenti presenti nel caffè (Higdon e Frei, 2006; van Dam et al., 2020). Ad esempio, numerose evidenze riportano come il caffè bollito o non filtrato risulti associato a un aumento del colesterolo sanguigno e delle patologie alle coronarie; questa tipologia di caffè, rispetto al caffè filtrato, presenta in maggior percentuale delle sostanze come i diterpeni cafestol e kahweol, che sembrerebbero i maggiori responsabili di questi effetti (Higdon e Frei, 2006). Altre ricerche, invece, riportano come l’assunzione di caffè non sia pericolosa per la salute, anche grazie all’azione di alcune delle sostanze in esso presenti che agiscono da antiossidanti e antinfiammatori (Cicero et al., 2023). Effettivamente, studi recenti dimostrano come la caffeina sia più sicura di quello che si credeva in passato, se consumata senza eccessi e da adulti in salute, ma resta comunque da chiarire se questa sostanza ha il potenziale di aumentare l’incidenza di malattie cardiache o di morte per malattie cardiache, soprattutto nel caso di popolazioni sensibili o a rischio, come persone con problematiche cardiache preesistenti o ipertensione, ma anche nel caso dei “metabolizzatori lenti”, considerati una categoria potenzialmente a rischio, in quanto sembra che abbiano più probabilità di essere soggetti ad attacchi di cuore non fatali causati dall’ingestione di caffeina (Julien et al., 2011).

La caffeina esercita anche altri effetti a livello periferico: agisce da vasodilatatore; aumenta la frequenza respiratoria ed è per questo usata come stimolante della respirazione in neonati con episodi di apnea ricorrenti; rilassa la muscolatura liscia bronchiale, agendo come farmaco antiasmatico, anche se la sua capacità di broncodilatazione è meno potente rispetto a quella della teofillina a parità di concentrazione; stimola la secrezione di acidi gastrici (anche se il caffè sembra altrettanto potente in questo) e secondo alcuni studi sembrerebbe in grado di ridurre la pressione dello sfintere esofageo inferiore, il che potrebbe contribuire ai sintomi del reflusso gastrico riportati da molti bevitori abituali di caffè; tra gli effetti è riportato anche un leggero aumento della diuresi (Benowitz, 1990; Julien et al., 2011). Il consumo di caffeina tardi nella giornata può avere effetti anche sul sonno, aumentandone la latenza e riducendone la qualità (van Dam et al., 2020).

Il consumo di caffeina risulta, inoltre, associato ad un' aumentata tolleranza al glucosio e ad un diminuito rischio di diabete mellito di tipo 2 (van Dam et al., 2004; Ding et al., 2014a), ma va tenuto in considerazione che lo stesso effetto è stato trovato con l' assunzione di caffè decaffeinato, il che potrebbe indicare che qualche altra sostanza presente nel caffè sia la responsabile di questi effetti, anche se la perdita di peso indotta dalla caffeina potrebbe comunque avere un ruolo importante (Greenberg et al., 2006).

Come si può notare, è estremamente importante distinguere tra gli effetti che la caffeina esercita sul nostro organismo e quelli esercitati dalle altre centinaia di componenti biologicamente attive presenti nel caffè; il caffè è, infatti, una complessa miscela di sostanze chimiche e, anche se la caffeina sembra essere l'ingrediente più fisiologicamente attivo, anche gli altri componenti possono causare effetti farmacologici addizionali. Nel caffè sono presenti, fra le altre, polifenoli (tra cui flavonoidi, tannini, melanine, acido clorogenico), carboidrati, vitamine, lipidi, alcaloidi, e non solo; alcune di queste sostanze sono antiossidanti, migliorano il microbioma intestinale e modulano il metabolismo di grassi e glucosio. Altre sostanze, come i diterpeni cafestol e kahweol, aumentano il livello di colesterolo sierico (Jee et al., 2001; van Dam et al., 2020). In ogni caso, bisogna sempre essere cauti nell'interpretazione dei dati relativi al consumo di caffeina; un buon modo per distinguere a livello sperimentale gli effetti della caffeina da quelli possibilmente causati da altre sostanze nel caffè è quello di somministrare caffeina pura oppure avere una condizione di controllo nella quale viene somministrato caffè decaffeinato (Mandel, 2002).

1.3.4 Meccanismo d'azione

Nel corso degli anni sono stati descritti e proposti diversi meccanismi d'azione che spiegassero gli effetti psicofisiologici che la caffeina esercita sul nostro organismo: le ipotesi che sono state vagliate riguardano meccanismi relativi alla mobilitazione intracellulare di Calcio, all' inibizione delle fosfodiesterasi e all' antagonismo a livello dei recettori dell' adenosina, una sostanza normalmente presente nell' encefalo. La ricerca in merito alle prime due ipotesi non ha portato risultati soddisfacenti mentre le evidenze hanno confermato che il meccanismo d'azione alla base degli effetti causati dalla caffeina è l'azione di antagonismo che esercita sui recettori dell' adenosina (Nehlig et al., 1992). L'ipotesi è stata formulata per la prima volta da Sattin e Rall nel 1970, in uno studio di laboratorio che ha dimostrato come, sotto diverse condizioni, la teofillina (una metilxantina e un metabolita della caffeina) potesse ridurre l'accumulo di cAMP (adenosina

monofosfato ciclico) in parti sezionate dell'encefalo, suggerendo che la teofillina potesse bloccare la stimolazione da parte dell'adenosina endogena della produzione di cAMP. Oggi sappiamo che la caffeina ha effettivamente una somiglianza strutturale con l'adenosina e per questo si lega facilmente agli stessi recettori bloccandone l'accesso, agendo così da antagonista. L'adenosina è un neuromodulatore che influenza il rilascio di vari neurotrasmettitori nel sistema nervoso centrale, attraverso un sistema diffuso che sembra esercitare un'azione sedativa; essa agisce, infatti, a livello presinaptico per inibire il rilascio di acetilcolina, norepinefrina, dopamina, GABA e serotonina e riduce le scariche spontanee neurali in diverse regioni del cervello, producendo sedazione e agendo da anticonvulsivante. Questi effetti sono mediati dall'azione di questo neuromodulatore su diversi recettori, principalmente i recettori A1 ad alta affinità e A2 a bassa affinità, i quali si trovano in tutto il corpo, incluso cervello, sistema cardiovascolare, respiratorio, renale, gastrointestinale e tessuto adiposo. I livelli di adenosina aumentano durante il giorno e favoriscono un'azione di induzione del sonno mentre la caffeina, agendo da antagonista, induce lo stato di veglia. La caffeina blocca, infatti, in modo non selettivo entrambi i recettori e inibisce in modo competitivo l'azione dell'adenosina già in concentrazioni simili a quelle del consumo giornaliero medio; agendo da antagonista, la caffeina rilascia norepinefrina, dopamina e serotonina nel cervello e aumenta la concentrazione di catecolamine nella circolazione, andando a invertire gli effetti inibitori dell'adenosina. Il blocco dei recettori dell'adenosina dato dalla caffeina può spiegare l'aumento della vigilanza, dell'acuità mentale e la debole gratificazione; gli effetti positivi possono essere, dunque, spiegati poiché attraverso il blocco dei recettori dell'adenosina i neuroni GABA-ergici normalmente da essa stimolati risultano inibiti, e quindi viene meno l'inibizione che queste proiezioni esercitano sul sistema di gratificazione dopaminergico dello striato. Si potrebbe quindi considerare l'azione della caffeina come un'azione di stimolazione indiretta dei centri dopaminergici dello striato, dato che inibisce gli effetti modulatori negativi dell'adenosina. In ogni caso, a differenza di sostanze come cocaina e amfetamine che agiscono tramite una stimolazione diretta dei centri dopaminergici, la caffeina non induce il rilascio di dopamina nel nucleo accumbens ma lo favorisce nella corteccia prefrontale responsabile dello stato di allerta e del debole effetto di rinforzo comportamentale (Benowitz, 1990; Nehlig et al., 1992; Nawrot et al., 2003; Julien et al., 2011).

1.3.5 Tolleranza e dipendenza

Il possibile potenziale di dipendenza e abuso della caffeina è un tema molto dibattuto: molte evidenze riportano come la caffeina possa indurre una dipendenza fisica tramite la soppressione degli effetti avversi causati dalla sospensione dell'assunzione della sostanza, ma non tutti i dati esistenti concordano con questa ipotesi. Effettivamente, l'uso cronico di caffeina, anche a basse dosi giornaliere di 100 mg, è associato con l'abitudine e con la tolleranza e la sua sospensione potrebbe produrre una sorta di leggera sindrome da astinenza (Juliano e Griffiths, 2004). Infatti, l'ingestione cronica sembra possa portare a una sintesi addizionale di recettori dell'adenosina, con uno spostamento dei recettori A1 verso uno stato ad alta affinità, il che porta a sua volta a un aumento della sensibilità funzionale all'adenosina (Benowitz, 1990). L'astinenza in persone che bevono grandi quantità di caffè si presenta con sintomi come cefalea, sonnolenza, affaticamento, difficoltà a concentrarsi e cattivo umore. Tendenzialmente, i sintomi d'astinenza iniziano gradualmente, arrivano al loro picco in uno o due giorni al massimo e terminano in pochi giorni. Anche se avvengono più raramente, in letteratura sono state riportate altre conseguenze legate all'astinenza da caffeina quali alterazioni delle capacità motorie e intellettuali, difficoltà di concentrazione, nausea, vomito, desiderio compulsivo per la sostanza e altri disturbi di tipo psicologico (Julien et al., 2011). In ogni caso, la sospensione graduale sembra risultare in meno sintomi rispetto all'interruzione repentina (Higdon e Frei, 2006).

La caffeina soddisfa alcuni criteri relativi alla dipendenza da droghe, in quanto, come accennato nel paragrafo precedente, essa condivide una certa specificità di azione con cocaina e amfetamine, ma non agisce direttamente sulle strutture dopaminergiche della gratificazione, dell'assuefazione e della motivazione. Questi deboli effetti di rinforzo positivo insieme alla soppressione dei sintomi d'astinenza possono potenzialmente spiegare la dipendenza fisica che si instaura per questa sostanza (Ferrè, 2008). Il sollievo dai sintomi dell'astinenza, infatti, viene ritenuto da alcuni un fattore importante nella soddisfazione di bere il caffè, specialmente nel caso del primo caffè della giornata (Benowitz, 1990). In una review del 2006, però, Satel analizza i parametri considerati per definire una sostanza a rischio di causare dipendenza, e conclude che non ci sono i presupposti per includere la caffeina nell'ambito di questa tipologia di sostanze. L'autrice sostiene che i sintomi d'astinenza che risultano dall'interruzione della sostanza sono riferiti a una dipendenza di tipo fisico, causata dall'adattamento a livello neurale nei confronti della sostanza, ma non una vera e propria dipendenza di tipo psicologico, di quelle che portano alla ricerca disperata per la sostanza.

L'autrice sostiene quindi che la dipendenza fisica che il consumo di caffeina può creare riguarda più che altro il mantenimento di una certa omeostasi a causa dell'adattamento neurale alla sostanza, ma non sembrano esistere prove di indicatori clinici di dipendenza, come difficoltà a regolarne il consumo o a interromperlo nonostante gli effetti avversi. Inoltre, la caffeina raramente può essere considerata pericolosa per il singolo consumatore o per l'ambiente e la società intorno a lui. Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione sono anche i fattori sociali e culturali che esistono intorno al consumo di caffeina, che contribuiscono nel rendere l'assunzione di questa sostanza un'abitudine piacevole e sociale, piuttosto che una vera e propria dipendenza.

1.3.6 Benefici e rischi

La caffeina è considerata come uno dei pochi aiuti ergogenici con efficacia documentata e minimi effetti collaterali; l'assunzione può dunque avere effetti positivi nel caso delle performance sportive (Magkos e Kavouras, 2005): alcuni studi hanno riportato, infatti, che bere due tazze di caffè prima di un evento sportivo può migliorare la performance di un atleta perché stimola il rilascio precoce di acidi grassi nel sangue, conservando in questo modo il glicogeno. In ogni caso, questi effetti sono meno funzionali rispetto a quelli esercitati dal riscaldamento muscolare (Harland, 2000). Come abbiamo già visto, poi, esistono dati che sostengono l'esistenza di una relazione inversa tra assunzione di caffeina e diabete mellito di tipo 2 (van Dam et al., 2004; Ding et al., 2014a), ma resta prematuro raccomandare ufficialmente la caffeina o il caffè come mezzo di prevenzione per questa malattia. Altre ricerche, invece, hanno riportato dati relativi a un potenziale benefico della caffeina nel caso della prevenzione del morbo di Parkinson, suggerendo anche in questo caso l'esistenza di una relazione inversa tra consumo di caffeina e sviluppo della malattia (Ross et al., 2000; Hernan et al., 2002); questa associazione, però, sembra essere tipica della popolazione maschile ma non di quella femminile (Ascherio et al., 2004) e si è ipotizzato che la motivazione risieda nell'utilizzo di terapie ormonali sostitutive a base di estrogeni per la menopausa da parte della popolazione femminile (Ascherio e Chen, 2003). Effettivamente, in campioni di donne che non avevano mai usato terapie a base di estrogeni post menopausa, è stata riscontrata la stessa associazione riscontrata negli uomini (Ascherio et al., 2004). Ovviamente, anche in questo caso, è necessaria un'estrema cautela nel considerare gli effetti protettivi e terapeutici della caffeina nei confronti di questa malattia neurodegenerativa. Un ulteriore potenziale effetto protettivo è stato identificato anche nei confronti di alcune malattie del fegato,

nello specifico cirrosi e carcinoma epatocellulare (Corrao et al., 2001; Tverdal e Skurtveit, 2003; Ruhl e Everhart, 2005).

Il trattamento dell'apnea nei neonati rappresenta, invece, l'utilizzo terapeutico maggiore: la caffeina, infatti, regolarizza il respiro ed è un broncodilatatore, ma richiede grandi dosi che sono associate a un rischio di maggior neurotossicità rispetto alla teofillina. Viene anche utilizzata in combinazione con farmaci analgesici, perché sembra aumentare gli effetti di farmaci come l'aspirina o il paracetamolo ma l'utilizzo non è sempre consigliato, in quanto esiste il rischio che la dipendenza fisica che la caffeina crea possa promuovere l'abuso cronico di questi farmaci. La caffeina può essere combinata anche con farmaci per il trattamento delle emicranie, ma la sua interruzione le precipita a causa dell'astinenza da caffeina. Altri utilizzi terapeutici includono il trattamento dell'ipotensione postprandiale in pazienti con insufficienza autonoma cronica, l'utilizzo in farmaci anoressizzanti nel caso di obesità e, se somministrata endovena, un pre-trattamento per facilitare e prolungare le convulsioni durante la terapia elettroconvulsiva usata nel trattamento della depressione resistente al trattamento (Benowitz, 1990; Sawynok, 1995; Magkos e Kavouras, 2005).

Anche in certi ambiti lavorativi che richiedono turni pesanti e mansioni faticose e monotone (come chi passa molto tempo alla guida) la caffeina potrebbe essere un buon aiuto, utile a mantenere i livelli di vigilanza elevati e contrastare la fatica. D'altronde, il consumo regolato di bevande a base di caffeina può essere utile anche nella routine quotidiana di un adulto sano, in quanto, nella società odierna, ci viene ormai chiesto di mantenere ritmi serrati e frenetici, e da qui probabilmente deriva anche la comune abitudine di consumare bevande a base di caffeina la mattina e/o prima di andare a lavoro, come anche nel corso dell'attività lavorativa, così che si possa avere un aiuto nel ristabilire l'efficienza in un momento di stanchezza o fatica (Dews, 1982).

Per quanto riguarda i rischi relativi al consumo di caffeina, nel corso degli anni ci sono state varie ipotesi che hanno messo in relazione il consumo di questa sostanza con diverse problematiche a livello di salute, quali malattie del sistema cardiovascolare, sviluppo di tumori, disturbi ossei legati alla diminuzione dei livelli di calcio corporei e problematiche relative alla gestazione e al feto. Le evidenze esistenti non supportano la possibilità che il consumo di caffeina aumenti il rischio o l'incidenza di tumore e, spesso, i risultati delle poche prove a favore dell'esistenza di questa associazione non risultano significativi se le analisi vengono corrette considerando il fumo di

sigarette (Higdon e Frei, 2006). Per quanto riguarda problematiche quali osteoporosi o fratture ossee, alcuni studi sembrano effettivamente riportare che il consumo di caffeina può causare modifiche dei livelli di Calcio, con un leggero spostamento dell'equilibrio in negativo (Heaney, 2002); questo potrebbe essere correlato ad un aumentato rischio di problemi alle ossa, specialmente nella popolazione anziana, ma anche in questo caso i dati non ci permettono di trarre conclusioni certe e Higdon e Frei nella loro revisione del 2006 ritengono che un'adeguata assunzione di calcio e di vitamina D e un consumo non eccessivo di caffeina (non oltre i 300 mg giornalieri) può aiutare a ridurre il rischio di osteoporosi o fratture ossee, soprattutto nella popolazione anziana. Le due aree in cui rimangono dubbi in merito al possibile effetto negativo del consumo di caffeina sono relative al funzionamento cardiovascolare e allo stato di gravidanza. Nel prossimo paragrafo approfondiremo il discorso sul sistema cardiovascolare, mentre per quanto riguarda gli effetti del consumo di caffeina in gravidanza, dati limitati e controversi emersi da varie ricerche (CARE Study Group, 2008; Jahnfar e Sharifah, 2009; Pollack et al., 2010) mostrano come anche in dosi ragionevoli sembra causare una diminuzione della vita fetale, mentre in dosi molto elevate potrebbe aumentare il rischio di aborto. D'altro canto, non sono stati dimostrati effetti sul peso alla nascita e sulla durata della gestazione o sull'incidenza di successive manifestazioni del disturbo da deficit di attenzione/iperattività (DDAI) (Linnet et al., 2009). In ogni caso, non sembra essere teratogena di per sé né sembra alterare il normale corso del travaglio e del parto (Browne, 2006). Nonostante le evidenze siano controverse, le linee guida per il consumo di caffeina consigliano di non superare i 300 mg al giorno nel corso della gravidanza (Nawrot et al., 2003; Higdon e Frei, 2006).

Anche se generalmente non considerata una sostanza pericolosa, l'overdose fatale in seguito all'assunzione di caffeina può avvenire nel caso di ingestione di grosse quantità della sostanza; la dose media considerata letale nell'uomo è di 10 g (100 tazze di caffè), anche se casi di mortalità sono stati riportati con ingestione di dosi dai 5 ai 50 g. Dosi elevate, anche se non necessariamente letali, possono portare a una significativa tossicità, che si può riflettere in sintomi come agitazione, delirio, crisi epilettiche, dispnea, aritmie cardiache, mioclono, nausea, vomito, iperglicemia e ipokaliemia. Anche senza arrivare alla tossicità, un forte consumo di caffeina (equivalente a circa 12 tazzine di caffè al giorno) può portare ad esacerbare gli effetti comportamentali, fino ad arrivare a uno stato di agitazione, ansietà e irrequietezza, correlato da sintomi quali tremori, respiro affannoso, palpitazioni e tachicardia, insonnia, nervosismo, mal di testa, dolori addominali,

nausea, vomito, diarrea e diuresi. (Higdon e Frei, 2006; Julien et al., 2011). In ogni caso, si parla di dosi estremamente elevate che sono ben lontane da quelle mediamente consumate quotidianamente dalla popolazione; infatti, la maggior parte delle persone sembra in grado di regolare in modo autonomo il consumo quotidiano di caffeina in modo da massimizzare i benefici e ridurre eventuali effetti spiacevoli (Smith, 2002). Ovviamente, a causa sia dell'ampia variabilità che esiste nel metabolismo di questa sostanza che di altri fattori che possono influire, esistono delle sub-popolazioni di persone che possono essere considerate più sensibili ad alcuni effetti della caffeina; persone che soffrono di disturbi d'ansia, ad esempio, tendono a essere maggiormente sensibili alle proprietà ansiogene della caffeina e in popolazioni di persone a rischio di o con malattie psichiatriche, un utilizzo eccessivo giornaliero può diventare rischioso per la salute e causare la sindrome del caffeinismo (Nawrot et al., 2003). Il caffeinismo è una sindrome clinica caratterizzata da sintomi sia centrali (aumento dell'ansia, agitazione, insonnia e cambiamenti dell'umore) che periferici (sintomi cardiovascolari come tachicardia, ipertensione, aritmia cardiaca e disturbi gastrointestinali come nausea, vomito e diarrea) prodotti da un forte uso o abuso di caffeina, di solito causato da dosi maggiori di 500/1000 mg (da 5 a 10 tazze di caffè). In persone con ansia basale anche dosi molto più basse possono portare al caffeinismo; addirittura, la caffeina sembrerebbe in grado di poter generare o facilitare crisi di panico in soggetti predisposti, ma non nel resto della popolazione sana. In ogni caso, la sindrome sembra risolversi con l'interruzione dell'assunzione di caffeina (Julien et al., 2011).

Tutto considerato, la caffeina sembra avere più effetti benefici di quanti siano i rischi, soprattutto considerando che gli effetti avversi sono associati, nella maggior parte dei casi, a dosi ben lontane da quelle del consumo medio. Le preoccupazioni maggiori, come già esposto, restano quelle relative ad alcuni degli effetti che questa sostanza ha sul sistema cardiovascolare, specialmente in popolazioni a rischio, alla necessità di un consumo cauto durante la gravidanza e al rischio che in determinate popolazioni di pazienti psichiatrici possa scatenare o aumentare stati di ansia o di panico. Un uso regolare sembra essere benefico a livello comportamentale e sembra possa portare a un miglior funzionamento mentale. Ovviamente, resta importante distinguere tra quantità normalmente consumate tramite bevande e cibi e l'uso eccessivo, soprattutto nel caso di individui sensibili. In conclusione, sarebbe poco prudente interpretare le evidenze attuali come raccomandazioni di assumere caffè o caffeina per prevenire diverse malattie, ma nel caso di adulti

in salute, il consumo di dosi moderate può essere consigliato come parte di uno stile di vita salutare (van Dam et al., 2020).

1.4 Caffeina e sistema cardiovascolare

Gli effetti del consumo di caffè e caffeina sul sistema cardiovascolare e sull'ipertensione arteriosa sono stati ampiamente discussi negli ultimi decenni, spesso con evidenze contrastanti fra loro. Questa non omogeneità dei risultati potrebbe esser dovuta, in parte, a problematiche legate alle condizioni sperimentali e alle diverse metodologie di registrazione usate, oltre che alle numerose possibili variabili confondenti che non sempre è facile tenere in considerazione; alcuni dei fattori che possono contribuire a dei risultati non coerenti fra loro sono, ad esempio, l'errata classificazione del consumo effettivo (dovuta sia alle misure self-report, nelle quali i soggetti spesso non riportano dati precisi, sia alle diverse tipologie di bevande consumate), lo sviluppo di tolleranza agli effetti della caffeina, il concomitante fumo di sigarette, lo stile di vita, la dieta e la personalità (Nawrot et al., 2003; Borghi, 2022; Cicero et al., 2023). Inoltre, per quanto il caffè sia il veicolo tramite il quale più frequentemente si assume caffeina, è importante distinguere, anche a livello sperimentale, tra consumo di caffè e caffeina: come già visto, infatti, il caffè contiene in media oltre 1000 composti chimici di cui molti biologicamente attivi ed essi possono avere effetti diversi rispetto a quelli della caffeina, a volte addirittura compensando gli effetti negativi della caffeina stessa sulla salute dell'uomo, grazie alle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie che alcune di queste sostanze posseggono (van Dam et al., 2020) oppure contribuendo a fattori di rischio cardiovascolari, come nel caso dei diterpeni cafestol e kahweol, i quali sembrano aumentare il livello di colesterolo sierico (Jee et al., 2001; van Dam et al., 2020).

Sappiamo che una dose di caffeina pari a quella contenuta in due tazze di caffè aumenta la pressione sanguigna a breve termine e causa un rilascio sistemico di epinefrina, norepinefrina e renina (Robertson et al., 1978), oltre a rilassare la muscolatura liscia dei vasi sanguigni e ad avere effetti inotropi positivi sul cuore (Dews, 1982). In persone che non consumano normalmente caffeina questi effetti sono più evidenti (Robertson et al., 1978), ma la tolleranza verso di essi si sviluppa velocemente, anche se potrebbe essere non completa per alcune persone (Lovallo et al., 2004); questa rapida tolleranza che il sistema cardiovascolare sviluppa nei confronti degli effetti

della caffeina è proprio uno dei fattori che complica i dati e i risultati delle ricerche. In ogni caso, studi recenti stanno riportando numerose prove a favore di effetti benefici e protettivi di un consumo abituale di caffè sull'incidenza delle malattie cardiache, sui valori pressori (Ding et al., 2014b) e sul rischio di mortalità generale (Gunter et al., 2017), specialmente nel caso di un consumo di 3-5 tazze al giorno di caffè filtrato (Ding et al., 2014b); dunque, oltre a non riscontrare nessun fattore di rischio nel consumo di caffè, la ricerca sta cominciando proprio ad identificare una relazione inversa tra consumo di questa bevanda e malattie delle coronarie, infarto e morte per cause cardiovascolari (Ding et al., 2014a; Kim et al., 2019). Questi effetti, però, sono stati riscontrati anche nel caso del consumo di caffè decaffeinato, il che indicherebbe che altre sostanze oltre alla caffeina hanno probabilmente un ruolo importante nell'associazione tra consumo di caffè e maggiore sopravvivenza nei consumatori abituali (Li et al., 2019; Borghi, 2022). Ovviamente, un consumo che eccede le dosi medie standard, invece, può essere associato a un potenziale rischio di eventi cardiovascolari avversi (Ding et al., 2014b).

Per quanto riguarda la caffeina in sé, evidenze derivanti da studi clinici dimostrano che con una singola dose inferiore ai 450 mg non viene registrato alcun aumento della frequenza o gravità delle aritmie né in persone sane né in pazienti a rischio di ischemia o con ectopia ventricolare (Myers, 1992), mentre, nel caso della frequenza cardiaca, i risultati sono contrastanti, ma tendono a non riscontrare nessun cambiamento significativo, o al massimo una diminuzione (non clinicamente rilevante) della stessa in seguito ad assunzione della sostanza (Green et al., 1996; Myers, 1992; Koenig et al., 2013; Turnbull et al., 2017). Come abbiamo visto, il consumo di caffè è associato ad un aumento del colesterolo sierico totale e LDL, ma le evidenze più recenti mostrano come ciò sembri mediato dall'azione dei diterpeni presenti nel caffè, più che dalla caffeina in sé (Jee et al., 2001; van Dam et al., 2020). Per quanto riguarda la possibile associazione tra caffeina e malattie delle coronarie, i risultati sono inconsistenti e non forniscono un quadro preciso della questione; inoltre, nessuna associazione è stata riscontrata tra caffeina e fibrillazione atriale (van Dam et al., 2020). Una metanalisi del 2014 (Ding et al., 2014b) è arrivata alla conclusione che un consumo di caffè fino a 6 tazze al giorno non risulta associato ad un aumentato rischio di malattie alle coronarie o infarto né nella popolazione sana, né in persone con storia di ipertensione, diabete o malattie cardiovascolari. Dai dati esistenti si può concludere che il consumo di caffeina da parte della popolazione sana non è associato ad un aumento significativo del rischio di malattie cardiovascolari, ma risulta piuttosto associato ad un aumento di alcuni fattori di rischio per le

malattie cardiache, come un aumento della pressione sanguigna e dei livelli plasmatici di omocisteina (Higdon e Frei, 2006).

Gli effetti che la caffeina esercita sulla pressione sanguigna sono molto dibattuti: diversi studi (Green et al., 1996; Myers, 1992; Waring et al., 2003) riportano che il consumo di una singola dose di caffeina a dosi inferiori ai 250 mg possa stimolare un aumento della pressione in modo acuto in adulti sani di entrambi i sessi, a prescindere da razza, età e valori pressori di base, e questo effetto, per quanto presente anche nel caso della pressione diastolica, sembra avere effetti più chiari a livello di quella sistolica. L'effetto, inoltre, risulta più marcato nel caso di popolazioni di persone anziane, ipertese o di persone che non consumano abitualmente caffeina (Nawrot et al., 2003); rimane, quindi, importante distinguere gli effetti in base alle diverse categorie di sub-popolazioni. In ogni caso, l'aumento della pressione che si riscontra è a breve termine e mostra un effetto di tolleranza al consumo abituale (van Dam et al., 2020), tolleranza che si sviluppa in 1-3 giorni, ma si può parzialmente perdere anche dopo solo 12 ore di astinenza (Nawrot et al., 2003). Andando a distinguere tra caffè e caffeina, però, i dati riportano che il consumo di caffeina pura risulta in un modesto aumento della pressione sistolica e diastolica (Noordzij et al., 2005), mentre negli esperimenti in cui viene utilizzato il caffè nessun effetto sostanziale sulla pressione viene riscontrato, nemmeno in campioni di persone ipertese (van Dam et al., 2020); effettivamente, alcuni dati sembrano indicare anche che la risposta pressoria sia maggiore quando la caffeina è amministrata endovena rispetto a quando assunta tramite caffè (Noordzij et al., 2005), a riprova dell'influenza delle altre sostanze presenti nel caffè. Dunque, sappiamo ormai che la caffeina aumenta la pressione sanguigna interagendo con i recettori dell'adenosina presenti nei vasi arteriosi e aumentando in modo acuto i livelli di catecolamine nel plasma, ma nel consumo di caffè quest'effetto è bilanciato dalla presenza di sostanze antiossidanti, che causano vasodilatazione e giocano, così, un ruolo importante nella regolazione del tono vascolare (Gocken et al., 2019). Quindi, anche se la caffeina può lievemente aumentare la pressione sanguigna (soprattutto in individui non abituati a bere il caffè), gli altri composti bioattivi possono compensare quest'effetto, con una risposta finale che può essere neutrale se non positiva (Borghini, 2022); in particolare, uno dei responsabili principali di questo effetto compensatorio nell'abbassare la pressione sembra essere l'acido clorogenico, anche se recenti evidenze hanno riscontrato un effetto minore anche della quercetina (Cicero et al., 2023).

La letteratura relativa all'impatto della caffeina sul funzionamento cardiovascolare si è spesso concentrata sull'analisi di diversi parametri in relazione all'assunzione di questa sostanza, come la frequenza cardiaca, la pressione sanguigna e, in generale, i parametri dell'attività cardiaca, mentre i dati relativi alla variabilità della frequenza cardiaca (HRV) risultano più scarsi e, per quanto gli studi esistenti a riguardo siano aumentati negli ultimi decenni, i risultati sono spesso controversi e non omogenei, probabilmente anche a causa di grosse differenze nelle metodologie e tecniche di registrazione usate, come anche a causa della complessità del fenomeno e dell'esistenza di vari fattori che lo influenzano che possono essere confondenti. Sappiamo che la caffeina stimola il sistema nervoso autonomo e studiare la variabilità della frequenza cardiaca è interessante proprio perché essa è un buon rappresentante delle relazioni esistenti tra ramo simpatico e parasimpatico nel controllo cardiaco, e può, quindi, essere un utile strumento da utilizzare per chiarire gli effetti della caffeina a livello autonomo, ed eventualmente accertare l'effettiva esistenza di benefici e rischi per la salute e il benessere dell'uomo (Koenig et al., 2013).

Una revisione sistematica del 2013 (Koenig et al., 2013) ha analizzato le varie ricerche esistenti per cercare di chiarire l'influenza della caffeina sulla frequenza cardiaca e sulla variabilità della frequenza cardiaca, prendendo in considerazione misure sia nel dominio del tempo che della frequenza. Purtroppo, a causa dell'ampia variabilità fra design degli studi, categorie di partecipanti, metodi di misurazione e misure registrate, riscontrare dei risultati omogenei è difficile, ma sono stati identificati alcuni risultati che sembrano essere consistenti fra le varie ricerche, tra i quali un aumento della misura nel dominio del tempo sNN50, nessun cambiamento della componente a bassa frequenza della variabilità della frequenza cardiaca (LF) e un aumento della componente ad alta frequenza della variabilità della frequenza cardiaca (HF), che rappresenta un aumento dell'attività parasimpatica mediata dal nervo vago. Anche una revisione del 2017 (Turnbull et al., 2017) ha preso in analisi diversi studi che hanno analizzato gli effetti della caffeina in relazione a diversi tipi di patologie cardiovascolari, utilizzando come marker diverse misurazioni cardiache, tra le quali la frequenza cardiaca e la variabilità della frequenza cardiaca e anche in questo caso, i dati analizzati risultano discordanti fra loro ed è quindi difficile giungere a una conclusione univoca.

Per quanto riguarda la frequenza cardiaca, la maggior parte degli studi non riscontra effetti significativi in seguito all'assunzione di caffeina; fra le ricerche prese in analisi da entrambe le

revisioni, infatti, alcune riportavano un aumento in seguito alla somministrazione acuta di una singola dose, mentre un numero maggiore di studi riportava una diminuzione significativa, tra cui, ad esempio, lo studio di Waring et al. (2003) e quello di Notarius e Floras (2012), il quale ha riscontrato una diminuzione significativa esclusivamente nella popolazione sana, ma non in pazienti con insufficienza cardiaca cronica. In ogni caso, la maggior parte degli studi analizzati non ha riscontrato alcun tipo di modifica significativa della frequenza cardiaca in seguito al consumo di caffeina. Sondermeijer et al. (2002) forniscono una possibile spiegazione per la mancata osservazione di cambiamenti a livello della frequenza cardiaca, sostenendo che gli effetti diretti autonomici della caffeina potrebbero parzialmente essere compensati dalla riduzione della frequenza cardiaca mediata dai riflessi barocettivi in risposta all'aumento pressorio.

Simili controversie si riscontrano se si prende in considerazione l'indice della variabilità della frequenza cardiaca: diversi studi riportano spesso diversi risultati, infatti, ed è spesso difficile confrontarli fra di loro a causa delle numerose differenze che esistono nei campioni di persone, nei dettagli delle registrazioni e nelle modalità di somministrazione, tutti fattori che potrebbero contribuire alle differenze riscontrate. Ad esempio, alcuni studi hanno somministrato la sostanza endovena (Notarius e Floras, 2012; Ulanovsky et al., 2014), ma la maggior parte si è avvalsa, invece, di somministrazioni orali tramite diversi mezzi, che possono essere capsule oppure bevande e sostanze nelle quali la caffeina viene disciolta, ma anche direttamente un espresso. Inoltre, la maggior parte degli studi si sono concentrati sugli effetti della caffeina sulla popolazione sana, ma alcuni ne hanno valutato gli effetti anche su pazienti diabetici di tipo 1 (Richardson et al., 2004), pazienti STEMI (Richardson et al., 2009) o pazienti con insufficienza cardiaca cronica (Notarius e Floras, 2012). I risultati differiscono anche in merito a quale particolare misura della variabilità della frequenza cardiaca gli studi hanno deciso di registrare; ad esempio, gli indici nel dominio del tempo mostrano risultati più inconsistenti rispetto a quelli nel dominio della frequenza. Nel dominio del tempo, l'unico risultato coerente riscontrato da Koenig et al. (2013) è stato relativo alla componente sNN50, che risulta aumentata in due studi (Richardson et al., 2004; Richardson et al., 2009), con un effetto significativo sia nella popolazione di persone sane che in quella di diabetici di tipo 1. Le misure nel dominio della frequenza mostrano, invece, un quadro leggermente più chiaro dell'impatto della caffeina sulla variabilità della frequenza cardiaca, anche se rimangono delle controversie. La componente ad alta frequenza della variabilità della frequenza cardiaca (HF-HRV) è la misura più frequentemente riportata (Hibino et al., 1997; Nishijima et al.,

2002; Sondermeijer et al., 2002; Richardson et al., 2004; Yeragani et al., 2005; Rauh et al., 2006; Monda et al., 2009; Richardson et al., 2009; Notarius e Floras, 2012), con solamente due studi che non hanno riscontrato un cambiamento significativo causato dalla caffeina (Rauh et al., 2006; Richardson et al., 2009) ed uno (Sondermeijer et al., 2002) che riporta una diminuzione, mentre la maggior parte ha dimostrato un aumento di questa componente. Nel caso della componente a bassa frequenza della variabilità della frequenza cardiaca (LF-HRV), essa è stata analizzata in 7 studi, di cui solo 2 riportano un cambiamento significativo (Nishijima et al., 2002; Yeragani et al., 2005), nello specifico, un aumento, che sembra risultare, però, da condizioni di esercizio fisico e non dall'ingestione della caffeina in sé: uno studio riporta, infatti, un aumento solo durante l'esercizio fisico e non a riposo (Nishijima et al., 2002), mentre l'altro riscontra un aumento solo in seguito all'attività fisica (Yeragani et al., 2005).

Andando a sintetizzare i risultati globali degli studi analizzati, la maggior parte riporta un effetto significativo della caffeina rispetto al placebo sulla variabilità della frequenza cardiaca, tranne uno studio che ha utilizzato un campione di consumatori abituali (Rauh et al., 2006) e il risultato più consistente è quello di un incremento della variabilità della frequenza cardiaca in seguito all'assunzione della caffeina, dato che solamente in un singolo studio è stata riscontrata una diminuzione in seguito a una singola somministrazione di 100 o 200 mg (Sondermeijer et al., 2002). Sembrerebbe, dunque, che la caffeina eserciti un effetto soprattutto sul sistema nervoso autonomo parasimpatico piuttosto che su quello simpatico nell'influenza del sistema cardiovascolare (Waring et al., 2003), ma la relazione resta ancora da chiarire, dato che non tutti gli studi concordano sugli effetti della caffeina a livello della branca parasimpatica del sistema nervoso autonomo. Comunque, gli effetti sembrano essere diversi a seconda del fatto che la popolazione sia di adulti sani, diabetici di tipo 1 o soggetti con insufficienza cardiaca cronica; i risultati differiscono, quindi, fra diverse popolazioni, ma è importante tenere in considerazione anche le diverse condizioni sperimentali. Ad esempio, la caffeina potrebbe avere diversi effetti sulla variabilità della frequenza cardiaca a seconda che ci si trovi in uno stato di quiete piuttosto che durante l'attività fisica: infatti, durante condizioni nelle quali predomina l'azione del sistema parasimpatico (riposo), la caffeina potrebbe avere un impatto sulle misure della variabilità della frequenza cardiaca (Hibino et al., 1997; Karapetian et al., 2012), mentre nel corso dell'esercizio fisico questo effetto potrebbe non persistere (Karapetian et al., 2012). I risultati, comunque, sono discordanti anche in questo caso, in quanto esiste un altro studio che riporta, invece, delle

differenze significative in seguito all'assunzione di caffeina non nella condizione a riposo ma piuttosto durante l'esercizio fisico (Nishijima et al., 2002), mentre Waring et collab. (2003) sostengono che la caffeina possa abbassare il rapporto LF/HF durante condizioni di riposo e attenuarne l'aumento durante l'esercizio fisico. Un'altra problematica relativa all'interpretazione dei risultati resta quella in merito alla vera causa dietro gli effetti riscontrati, ossia se essi dipendano esclusivamente dall'assunzione di caffeina oppure siano influenzati dalle condizioni sperimentali: Rauh e collab. (2006), ad esempio, sostengono che un aumento dell'attività parasimpatica potrebbe essere secondario ad un rilassamento generale dei partecipanti nel corso dell'esperimento e Monda e collab. (2009) hanno riscontrato effetti significativi della caffeina sulla variabilità della frequenza cardiaca solo nella condizione in cui il partecipante si trovava in posizione supina, piuttosto che seduto. Un altro studio (Bonnet et al., 2005) riporta un aumento del rapporto LF/HF successivo al consumo di caffeina solo durante il sonno REM e per spiegare questo dato viene ipotizzato che questo aumento potrebbe esser dovuto al relativo aumento dell'attività simpatica nel corso del sonno REM, il quale rende i soggetti più sensibili agli effetti simpato-mimetici della caffeina.

In conclusione, basandoci sulle numerose evidenze esistenti, sembrerebbe che la caffeina stimoli l'attività di controllo vagale (dunque parasimpatica) sul sistema cardiovascolare, anche se i risultati non sono sempre coerenti ed omogenei fra loro, probabilmente a causa di varie differenze esistenti fra diversi studi, relative sia alla popolazione studiata, che alle misure e alle metodologie usate che alle condizioni sperimentali. Sarebbero necessari ulteriori studi che tengano in considerazione diversi aspetti, come il consumo abituale di caffeina, lo stato di salute e l'attività basale del sistema nervoso autonomo, ma anche l'impatto di tolleranza, deprivazione e disintossicazione nei consumatori abituali, oltre che possibili studi longitudinali sull'impatto della sostanza a lungo termine e sull'effetto della disintossicazione a livello della variabilità della frequenza cardiaca (Koenig et al., 2013).

1.5 Caffeina e frequenza di ammiccamento

Sappiamo che la caffeina è uno stimolante che aumenta la vigilanza e migliora la performance, soprattutto nel caso di situazioni a basso arousal e abbiamo anche visto che essa ha un effetto indiretto di stimolazione dopaminergica, grazie all'azione di antagonismo che esercita nei

confronti dei recettori dell'adenosina. La frequenza di ammiccamento (o blink rate), come detto in precedenza, può essere considerata un buon indice comportamentale dei livelli di attenzione e di vigilanza di una persona ed è stata correlata proprio all'attività dopaminergica, con diversi studi che la considerano come un potenziale indice di questa attività a livello neurale. Dati questi presupposti, sarebbe interessante ricercare dati che mettano in relazione i cambiamenti nell'azione di ammiccamento spontaneo e nella sua frequenza con il consumo di caffeina, così da poter eventualmente dimostrare come la frequenza di ammiccamento possa essere un indice utile per identificare gli effetti della caffeina a livello fisiologico. Purtroppo, non esistono in letteratura molti studi che hanno analizzato una possibile relazione esistente tra il consumo di caffeina e la frequenza di ammiccamento, o altre variabili oculari, quindi dai dati esistenti in letteratura, è difficile giungere ad una conclusione.

Uno studio del 2008 di Michael e collab. ha indagato gli effetti della caffeina sulla performance di persone non affaticate e vigili per mezzo di un nuovo sistema che utilizza l'oculografia riflettente a infrarossi per misurare diverse variabili oculari con lo scopo di ottenere dei valori relativi alla vigilanza/sonnolenza, integrando i valori relativi alle metriche oculari in un punteggio di "sonnolenza" (*drowsiness*); la scala utilizzata si è dimostrata sensibile ai cambiamenti nel livello di vigilanza/sonnolenza a causa della deprivazione da sonno, e dunque gli autori si aspettavano che lo fosse anche agli effetti della caffeina. Lo studio si è voluto concentrare su partecipanti in condizioni vigili in quanto è ormai ben noto come la caffeina sembri avere effetti più marcati sulla performance e sulla vigilanza nel caso di situazioni a basso arousal o di stanchezza, come nel caso di soggetti deprivati del sonno, ma è più difficile (e ci sono meno studi) stabilire gli effetti della caffeina in soggetti vigili a causa di diverse difficoltà nel misurare oggettivamente la sonnolenza. Lo studio in questione ha dimostrato come la vigilanza venga aumentata e la performance migliorata anche in partecipanti vigili, in seguito all'assunzione di caffeina, con tempi di reazione più brevi e punteggi alla scala di "sonnolenza" più bassi nella condizione caffeina, indicando quindi una minor durata totale degli ammiccamenti e della velocità di apertura e chiusura delle palpebre; questi effetti identificati erano evidenti già 30 minuti dopo l'assunzione e persistevano per un massimo di 3 ore.

Prima di questo studio, non sono stati riscontrati altri esperimenti che abbiano esaminato gli effetti dell'assunzione di caffeina sulla durata o sulla velocità dell'ammiccamento o gli effetti della

caffeine su nessuna altra variabile oculare in partecipanti vigili, mentre i pochi studi esistenti che hanno indagato gli effetti della caffeina su variabili oculari si sono focalizzati su partecipanti con deprivazione totale o parziale del sonno; in ogni caso, quasi nessuno studio ha riportato degli effetti significativi. Non ci sono evidenze di cambiamenti significativi in seguito alla somministrazione di caffeina nel caso del diametro pupillare, della latenza della contrazione pupillare (Minzhong et al., 2004) e della frequenza di ammiccamento (Horne e Reyner, 1996) e l'unico effetto riscontrato è stato una tendenza all'aumento della velocità dei movimenti saccadici (Minzhong et al., 2004). Un ulteriore studio che si è occupato di analizzare la possibile relazione tra consumo di caffeina e variabili oculari è uno studio del 2003 (Smith et al., 2003) nel quale è stata somministrata la clonidina ai partecipanti, sostanza che ha effetti inibitori, utilizzata per abbassare i livelli di arousal; in questo esperimento, la somministrazione di caffeina in alcune condizioni sperimentali era in grado di controbilanciare l'azione inibente esercitata dalla clonidina a livello fisiologico, inclusa la diminuzione mostrata nella velocità dei movimenti saccadici causata dalla clonidina.

Uno studio molto recente che ha indagato gli effetti della caffeina sulla frequenza di ammiccamento in adulti durante una conversazione ha riscontrato effetti significativi della caffeina sulla frequenza di ammiccamento (Alozie et al., 2022). Lo studio ha utilizzato 1.5 g di polvere Nescafé mescolata con 50 ml di acqua e ha registrato la frequenza di ammiccamento ad intervalli di 15 minuti, quindi 15, 30, 45 e 60 minuti dopo la somministrazione di caffè. In questo studio è stato effettivamente riscontrato un decremento significativo della frequenza di ammiccamento nel corso della conversazione, con una diminuzione costante tra i 15 e i 60 minuti, con la media registrata ai 60 minuti che dimostrava un aumento rispetto ai valori precedenti, ad indicare che forse i valori stavano tornando verso quelli della baseline, suggerendo così che gli effetti della caffeina sulla frequenza di ammiccamento negli adulti possano durare almeno per un'ora.

In ogni caso, gli studi relativi a questa tematica sono pochi e i risultati molto scarsi; Michael e collab. (2008) ipotizzano che una possibile spiegazione di questa scarsità di risultati potrebbe essere dovuta al fatto che in molti studi le variabili oculari misurate non siano abbastanza sensibili ai cambiamenti della vigilanza tanto da poterne dimostrare gli effetti. Ad esempio, alcuni autori sostengono che variabili come la frequenza di ammiccamento e la velocità dei movimenti saccadici sembrano correlare poco con decrementi della performance in soggetti deprivati dal sonno (Bocca e Denise, 2006; Caffier et al., 2003); inoltre, la frequenza di ammiccamento, come già descritto, è

altamente influenzata da differenze individuali e differenze relative al compito (Caffier et al., 2003; Stern et al., 1984). Nello studio di Michael e collab. del 2008 sono stati riscontrati risultati significativi probabilmente perché la registrazione si è basata sulla misurazione di diverse variabili oculari piuttosto che una soltanto, rendendo quindi la scala più sensibile a cambiamenti minimi nella vigilanza rispetto a misure che si basano solo sulla frequenza di ammiccamento piuttosto che solo sulla risposta pupillare.

CAPITOLO 2: METODO

2.1 Ipotesi e obiettivi

La diffusione a livello mondiale della caffeina è dovuta ai numerosi effetti positivi che questa sostanza esercita sul nostro organismo, sia dal punto di vista delle abilità fisiche che cognitive. Anche a livello ingenuo, infatti, la caffeina viene ritenuta una sostanza che ci rende più attivi ed efficienti nella vita quotidiana, mentre a livello scientifico, è ormai noto come questa sostanza possa ampiamente influenzare il funzionamento del nostro organismo; risulta, quindi, sempre più interessante indagarla per poterne chiarire benefici e rischi.

Questo studio è stato realizzato con l'intenzione di contribuire alla vasta letteratura già esistente in merito agli effetti farmacologici della caffeina. L'obiettivo principale è stato quello di analizzare alcuni tipi specifici di attività psicofisiologica in risposta all'assunzione di questa sostanza, tramite la registrazione della frequenza di ammiccamento e della frequenza cardiaca, dalla quale è stata, poi, ricavata anche la variabilità della frequenza cardiaca.

Molta della letteratura recente ha affrontato queste tematiche, producendo una grande quantità di dati in merito, ma nonostante ciò, i risultati non sono sempre omogenei e, anzi, spesso risultano discordanti fra di loro. Questa eterogeneità dei dati disponibili può essere attribuita a diverse ragioni: da un lato, sappiamo che esistono numerose differenze interindividuali sia nei livelli basali della frequenza di ammiccamento (Bentivoglio et al., 1997; McMonnies, 2010) e della variabilità della frequenza cardiaca (Berntson et al., 2007; Shaffer et al., 2014) che nel modo in cui il nostro organismo risponde all'assunzione della caffeina (Nawrot et al., 2003; Julien et al., 2011). Esiste, inoltre, un'ampia variabilità fra i disegni degli studi, fra i partecipanti (età, stato di salute, sesso), fra i metodi di misurazione utilizzati e fra le misure registrate (Koenig et al., 2013). I risultati, infatti, differiscono fra diverse popolazioni di soggetti, a seconda che siano popolazioni di persone sane oppure popolazioni cliniche, ma anche le diverse condizioni sperimentali spesso sembrano giocare un ruolo importante; ad esempio, la caffeina sembra esercitare effetti diversi a seconda del fatto che ci si trovi in uno stato di quiete, piuttosto che in uno stato fisicamente più attivo (Hibino et al., 1997; Karapetian et al., 2012). Oltre a ciò, sappiamo che gli effetti della caffeina possono essere modulati da diversi fattori (genetici e ambientali) che influenzano la farmacocinetica della

sostanza, dagli effetti legati alla tolleranza e dall'eventuale presenza di sintomi di astinenza (Turnbull et al., 2017). Un ulteriore effetto che può confondere i risultati riguarda le differenze che esistono tra l'assunzione di caffè rispetto a quella di caffeina pura; come abbiamo visto, infatti, la caffeina è una delle tante sostanze farmacologicamente attive presente nel caffè ed essa esercita alcuni effetti che non sono necessariamente gli stessi esercitati dagli altri composti. Abbiamo già nominato, ad esempio, le proprietà antiossidanti e antinfiammatorie di alcune di queste sostanze quali l'acido clorogenico, come anche l'effetto che i diterpeni esercitano sui livelli di colesterolo (Higdon e Frei, 2006; van Dam et al., 2020). E' dunque importante interpretare con cautela i dati sulla caffeina e un buon modo per studiarne gli effetti esclusivi a livello sperimentale è quello di somministrare la sostanza pura oppure di avere una condizione di controllo che preveda l'assunzione di caffè decaffeinato (Mandel, 2002).

Gran parte della letteratura esistente si è concentrata sulle interazioni che la caffeina ha con il nostro sistema cardiovascolare; come ampiamente già discusso, essa esercita degli effetti di leggera stimolazione a livello cardiaco e pressorio, con risultati che tendono ad indicare un effetto di debole stimolazione cardiaca e la capacità di innalzare leggermente la pressione sanguigna a breve termine, soprattutto nel caso di persone che non sono abituate al consumo della sostanza (Julien et al., 2011; van Dam et al., 2020).

In merito agli effetti che la caffeina ha sulla frequenza cardiaca, i risultati, seppur non sempre coerenti l'uno con l'altro, non sembrano dimostrare un cambiamento significativo, se non una leggera diminuzione non clinicamente significativa riportata da alcuni studi, la quale potrebbe essere un effetto mediato dai riflessi barocettivi in risposta all'aumento della pressione (Sondermeijer et al., 2002). Dunque, in base ai dati esistenti, in questo studio non era atteso alcun cambiamento significativo della frequenza cardiaca.

Per quanto riguarda la variabilità della frequenza cardiaca, essa è una misura estremamente interessante, in quanto, come abbiamo visto, può essere un buon indice del controllo del sistema nervoso autonomo a livello cardiaco e dell'equilibrio tra branca simpatica e parasimpatica (Berntson et al., 2007; Shaffer et al., 2014). Anche in questo caso, i risultati in letteratura sono spesso discordanti fra loro, ma la tendenza più comunemente riportata sembrerebbe indicare che la caffeina esercita un effetto soprattutto sul sistema parasimpatico nell'ambito del controllo cardiaco, effetto dimostrato da risultati che riportano spesso un aumento della variabilità della

frequenza cardiaca in seguito all'assunzione della sostanza (Koenig et al., 2013). Gli studi esistenti prendono spesso in considerazione diverse variabili relative alla variabilità della frequenza cardiaca; in questo studio, abbiamo deciso di utilizzare la RMSSD, una misura nel dominio del tempo che riflette il tono vagale (Kleiger et al., 2005) ed è fortemente correlata con la componente ad alta frequenza della variabilità della frequenza cardiaca (HF-HRV) (Kleiger et al., 2005). La RMSSD è anche relativamente libera da influenze esercitate dalla respirazione, al contrario dei parametri ad alta frequenza (Pentilla et al., 2001; Hill e Siebenbrock, 2009) ed è normalmente preferita ad altre misure nel dominio del tempo in quanto fornisce una migliore stima del tono vagale (Laborde et al., 2017). Dati questi presupposti e visti i risultati riscontrati in letteratura, in questo esperimento si è ipotizzato che l'assunzione di caffeina potesse avere un effetto a livello della variabilità della frequenza cardiaca e, nello specifico, era previsto un aumento dell'indice RMSSD.

Il caso della frequenza di ammiccamento è, invece, diverso, in quanto molti meno studi ne hanno indagato il potenziale ruolo come indice dei cambiamenti fisiologici conseguenti all'assunzione di caffeina; come abbiamo precedentemente descritto, da un lato, la frequenza di ammiccamento sembra essere un buon indice in grado di monitorare lo stato di vigilanza e di fatica mentale di una persona (Stern et al., 1994; McIntire et al., 2014; Maffei e Angrilli, 2018) e dall'altro, la caffeina sembra avere degli effetti proprio sullo stato di vigilanza/sonnolenza di chi la consuma (Smith et al., 2002; Smith et al., 2003). Proprio per questo motivo, alcuni studi si sono focalizzati su questo aspetto e hanno indagato le variazioni di questo indice in seguito al consumo di caffeina per poterne rilevare l'eventuale efficacia come parametro che indichi lo stato di vigilanza/sonnolenza di una persona; purtroppo, questi studi non sono numerosi e quelli che hanno effettivamente riscontrato un cambiamento significativo sono ancora meno. Tra quelli che hanno rilevato un effetto significativo della caffeina, Michael e collab. (2008) hanno riportato una diminuzione della frequenza di ammiccamento in seguito all'assunzione di caffeina nell'ambito dello svolgimento di compiti di vigilanza, e uno studio di Alozie e collab. del 2022 ha riscontrato sempre una diminuzione della frequenza di ammiccamento in adulti impegnati in una conversazione. Nel caso della nostra ricerca, però, la frequenza di ammiccamento è stata registrata a riposo e, dunque, i partecipanti non erano impegnati in nessun tipo di attività o compito che potesse interferire con l'attività di ammiccamento. Dalla letteratura, sappiamo che l'ammiccamento spontaneo a riposo correla positivamente con l'attività dopaminergica a livello fronto-striatale (Jongkees e Colzato,

2016), e sappiamo anche che questa attività viene stimolata dall'azione della caffeina a livello centrale; l'assunzione di questa sostanza, infatti, favorisce il rilascio di dopamina nella corteccia prefrontale, azione responsabile dello stato di allerta e del debole effetto di rinforzo comportamentale (Nehlig et al., 1992; Nawrot et al., 2003; Julien et al., 2011). Esistono evidenze che dimostrano, ad esempio, che un'aumentata attività dopaminergica a riposo, stimolata dall'assunzione di droghe o sostanze, risulta essere associata a una maggiore frequenza di ammiccamento (Jongkees e Colzato, 2016). In questo studio, abbiamo dunque deciso di includere anche la registrazione di questo segnale fisiologico così da poterne approfondire il suo possibile ruolo come indice dei cambiamenti fisiologici innescati dalla caffeina, partendo dal presupposto che la somministrazione di caffeina potesse indurre un aumento della frequenza di ammiccamento, rispetto al placebo.

L'ipotesi di partenza di questo studio prevedeva, dunque, che l'assunzione di 200 mg di caffeina avrebbe dovuto avere degli effetti a livello fisiologico rispetto al placebo: nello specifico, ci si aspettava che l'assunzione di caffeina aumentasse sia la frequenza di ammiccamento che la variabilità della frequenza cardiaca (RMSSD), mentre nessun cambiamento è stato ipotizzato nel caso della frequenza cardiaca.

Lo studio è stato strutturato con un disegno "entro i soggetti", in modo tale che le diverse condizioni non differissero tra gruppi di persone e che lo stesso soggetto partecipasse a entrambe le condizioni sperimentali. Tutti i partecipanti sono, quindi, venuti due volte in laboratorio e si sono sottoposti a entrambe le condizioni, caffeina e placebo. La decisione di strutturare lo studio in questo modo è stata presa in base alle raccomandazioni presenti in letteratura, le quali riportano come un disegno "entro i soggetti" possa avere dei benefici rispetto a uno studio "tra i soggetti". Questo tipo di studi offre, infatti, un miglior controllo di tipo sperimentale, contribuisce ad eliminare le differenze interindividuali nella frequenza respiratoria, richiede meno partecipanti e riduce l'impatto di fattori esterni come l'assunzione di medicinali, alcool o fumo di sigarette (Laborde et al., 20; Quintana e Heathers., 2014). Soprattutto nel caso della variabilità della frequenza cardiaca, a causa dell'alta variabilità interindividuale e delle complesse interazioni fisiologiche che la influenzano, disegni "entro i soggetti" sono altamente consigliati (Quintana e Heathers, 2014). Effettivamente, la maggior parte degli studi presi in considerazione ha spesso usato disegni di tipo "entro i soggetti", normalmente con disegni di tipo crossover a doppio cieco

con placebo (Koenig et al., 2013; Turnbull et al., 2017). Dato che le registrazioni sono avvenute in giorni diversi, a distanza di una settimana l'una dall'altra, l'orario di convocazione del partecipante è stato mantenuto costante (Laborde et al., 2017), così da poter controllare l'influenza esercitata dai ritmi circadiani di ciascun individuo, in modo tale da mantenere le condizioni sperimentali il più possibilmente simili fra le due sessioni. In questo studio, per isolare l'effetto della caffeina, è stato deciso di utilizzare della caffeina pura disciolta in una bevanda e un placebo per il confronto (Mandel, 2002).

2.2 Partecipanti

La ricerca ha coinvolto un totale di 34 partecipanti, tutti iscritti all'Università di Padova, di cui 10 maschi e 24 femmine. La scelta del campione è avvenuta su base volontaria: agli studenti è stato illustrato lo studio e le intenzioni dello studio, dopodiché è stato aperto un modulo libero per le iscrizioni. Per poter partecipare alla ricerca, agli studenti è stato chiesto di compilare un'anamnesi preventiva che potesse permettere sia di reperire delle informazioni d'interesse che di prendere in considerazione solo i candidati idonei per lo studio. I criteri di esclusione che sono stati tenuti in considerazione hanno riguardato principalmente lo stato di salute della persona (stato di gravidanza, rischio di epilessia o malattie cardiache); tutti i partecipanti che non rispettassero anche solo uno di questi criteri relativi alla salute, non sono stati contattati. Quelli che sono stati richiamati a partecipare all'esperimento, invece, hanno poi compilato uno specifico modulo di consenso informato, conforme alle direttive del Comitato Etico del Centro HIT del Dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova, che veniva consegnato firmato prima dello svolgersi dell'esperimento. Inoltre, per poter prendere parte allo studio, i partecipanti hanno dovuto presentare, prima dell'inizio delle sessioni sperimentali, un'autorizzazione firmata del proprio medico che acconsentisse all'assunzione di 200 mg di caffeina in base alle condizioni di salute del soggetto. Ad ogni soggetto veniva richiesto di non assumere caffè o nessun altro tipo di bevanda o sostanza stimolante nelle 12 ore precedenti la somministrazione.

Un solo soggetto è stato escluso dalle analisi a causa di problemi tecnici nel corso della registrazione; il campione valido finale è stato, dunque, di 33 individui, di cui 9 maschi e 24 femmine. L'età dei soggetti facenti parte del campione valido andava dai 21 ai 27 anni ($M = 23.18$; $DS \pm 1.89$) con i maschi che presentavano un'età media leggermente maggiore ($M = 24.1$; $DS \pm 2.52$) rispetto alle femmine ($M = 22.83$; $DS \pm 1.52$). La maggior parte dei partecipanti faceva uso

abituale di caffeina, con l'eccezione di 5 soggetti; fra i consumatori, il consumo della bevanda andava da 1 unità fino ad un massimo di 4 unità giornaliere ($M = 1.85$; $DS \pm 1.06$). Quasi nessun partecipante ha affermato di consumare coca cola, con l'eccezione di 2 soggetti che hanno dichiarato di assumerla saltuariamente e una sola persona ha affermato di assumere sporadicamente energy drink; 10 persone hanno affermato di consumare thè quotidianamente ($M = 0.54$; $DS \pm 1.06$). Tra i partecipanti, inoltre, 5 hanno sostenuto di soffrire di emicrania, 16 si sono dichiarati fumatori, nessuno ha dichiarato di fare uso di sostanze psicoattive e 7 hanno dichiarato di assumere farmaci abitualmente, nello specifico la pillola anticoncezionale.

Essendo uno studio “entro i soggetti” (*within-subject design*), i partecipanti non sono stati divisi in diversi gruppi, ma hanno tutti preso parte a entrambe le condizioni sperimentali; ogni singolo partecipante si è, dunque, presentato in laboratorio per due volte. Sono state utilizzate le sigle S1 e S2 per distinguere tra la prima e la seconda sessione sperimentale a cui i soggetti hanno preso parte. La differenza sostanziale e fondamentale fra S1 e S2 era l'assunzione di 200 mg di caffeina in una delle due somministrazioni, alternata, nell'altra somministrazione, alla condizione placebo.

2.3 Questionari

Nel corso di questo studio sono stati utilizzati due diversi tipi di questionari, somministrati entrambi per due volte nel corso dell'esperimento: si tratta del PANAS (Positive Affect and Negative Affect Scales) e dello STAI-Y (State-Trait Anxiety Inventory).

2.3.1 Positive Affect and Negative Affect Scales (PANAS)

Il Positive Affect and Negative Affect Scales (Watson et al., 1988) è un questionario che valuta gli stati affettivi, sia positivi che negativi, che il soggetto ha sperimentato nelle due settimane precedenti la somministrazione.

Il questionario è composto da 20 aggettivi che valutano due dimensioni indipendenti fra loro: l'affetto positivo e l'affetto negativo. 10 aggettivi sono inclusi nella sottoscala che misura gli stati affettivi positivi (PA) e gli altri 10 nell'altra sottoscala che indaga gli stati affettivi negativi (NA). La sottoscala PA riflette quanto una persona si sente entusiasta, attiva e determinata, mentre la sottoscala NA rispecchia stati emotivi spiacevoli generali come la rabbia, la colpa e la paura. Al soggetto viene chiesto di valutare quanto l'aggettivo presentato rifletta il suo modo di sentirsi

normalmente, utilizzando una scala Likert a 5 punti (dove 1 corrisponde a “per nulla” e 5 a “molto”).

La versione originale è stata sviluppata e validata nel 1988 da Watson, Clark e Tellegen e possiede buone proprietà psicometriche: il coefficiente di consistenza interna della sottoscala PA varia tra .86 a .90, mentre quello della sottoscala NA varia tra .84 e .87. Il test presenta anche una buona validità convergente e divergente. Le due sottoscale presentano una bassa correlazione fra loro (tra -.12 e -.23) e ciò è coerente con l’ipotesi che i due fattori (PA e NA) siano indipendenti tra loro. Le due sottoscale presentano anche una buona fedeltà test-retest.

La versione italiana del PANAS è stata validata da Terracciano (Terracciano, McCrae e Costa, 2003) su un campione di 600 soggetti e ha replicato le ottime caratteristiche psicometriche della versione originale.

2.3.2 State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y)

Lo State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y) è un questionario di autovalutazione utilizzato per misurare l’ansia di stato e di tratto (Spielberger, 1989). Il questionario è costituito da 40 item ai quali il soggetto deve rispondere tramite una scala Likert a 4 punti (dove 1 corrisponde a “per nulla” e 4 a “moltissimo”), in base a quanto le diverse affermazioni rispecchiano come il soggetto si percepisce. 20 di questi item misurano l’ansia di stato e 20 l’ansia di tratto. Il questionario si divide, infatti, in due scale indipendenti (Y1 e Y2) che misurano questi due diversi costrutti relativi all’ansia: lo STAI-Y1 misura l’ansia di stato, dunque uno stato emotivo di tensione relativo a uno specifico momento, mentre lo STAI-Y2 valuta l’ansia di tratto, ovvero una caratteristica stabile della personalità. Nelle istruzioni relative alla compilazione, al soggetto viene chiesto di compilare la sottoscala STAI-Y1 in base a come si sente nel momento della somministrazione del questionario e la sottoscala STAI-Y2 in base a come il soggetto si sente abitualmente. Punteggi più elevati indicano un maggiore stato di ansia, in entrambe le scale.

La versione italiana è stata curata da Pedrabissi e Santinello (1989) ed è stata testata sulla stessa tipologia di campioni utilizzati nella versione originale, ossia un campione di studenti delle scuole superiori, uno di adulti lavoratori e uno di reclute militari. L’affidabilità test-retest misurata a un mese di distanza riporta un coefficiente di .49 per la scala relativa all’ansia di stato e un coefficiente di .82 per la scala relativa all’ansia di tratto. La coerenza interna (alfa di Cronbach) varia da .91 a

.95 per la scala STAI-Y1 e da .85 a .90 per la scala STAI-Y2. I diversi risultati relativi all'alfa di Cronbach dipendono dai diversi campioni considerati, in quanto la coerenza interna è stata valutata sui diversi campioni precedentemente nominati.

In questo esperimento è stata utilizzata solamente la sottoscala STAI-Y1 relativa all'ansia di stato.

2.4 Materiale e stimoli

L'esperimento è stato svolto presso un laboratorio situato all'interno del Dipartimento di Psicologia Generale dell'Università degli Studi di Padova. Nella stanza erano presenti due scrivanie: una che fungeva da postazione per lo sperimentatore incaricato di registrare il segnale psicofisiologico e un'altra su cui erano posti due computer fissi utilizzati dai soggetti per l'esecuzione di alcuni task cognitivo-comportamentali. Davanti al computer con gli stimoli c'era una sedia comoda dove far sedere i soggetti.

Dopo aver fatto accomodare e aver messo a proprio agio il partecipante, veniva fornita una semplice spiegazione della procedura di applicazione degli elettrodi, per tranquillizzare la persona ed evitare che si agitatesse durante il montaggio. Per la pulizia della pelle, propedeutica all'abbassamento delle impedenze, è stata applicata sui punti di interesse la NuPrep, una pasta abrasiva, tramite l'utilizzo di un cottonfioc. Per la registrazione psicofisiologica sono stati utilizzati cinque elettrodi, ognuno di 10 mm in Ag/AgCL, al fine di misurare la frequenza cardiaca e la frequenza di ammiccamento. Per quanto concerne la registrazione del segnale cardiaco, gli elettrodi sono stati applicati seguendo il modello del triangolo di Einthoven (configurazione Lead II modificata con montaggio prossimale), mentre per registrare la frequenza di ammiccamento, i due elettrodi sono stati posizionati sopra e sotto all'occhio sinistro, in corrispondenza della pupilla (elettrooculografia verticale). Per far aderire gli elettrodi alla pelle, è stato utilizzato il gel conduttore Aquagel. Una volta applicati sulla pelle del partecipante, gli elettrodi venivano poi collegati ad un amplificatore che, a sua volta, era collegato ad un PC attraverso una scheda di conversione analogico-digitale. La frequenza di campionamento era di 250 Hz. E' stato utilizzato un personal computer portatile per l'acquisizione del segnale psicofisiologico, mentre per la somministrazione degli stimoli, come già detto, sono stati utilizzati due computer fissi. Per l'acquisizione del segnale è stato utilizzato un programma *ad hoc* creato tramite il pacchetto LabView 7, della ditta National Instruments.

Per quanto riguarda la somministrazione di caffeina, essa è stata somministrata oralmente, per mezzo di una bevanda che conteneva acqua e gassosa. Le bevande, precedentemente preparate ed etichettate con dei nomi-simbolo (Rosso e Oro), potevano contenere caffeina o no. Nel caso del placebo (Oro), veniva aggiunto alla bevanda dello zucchero a velo, mentre nel caso della condizione sperimentale che prevedeva l'assunzione di caffeina (Rosso), veniva sciolto nell'acqua un concentrato di caffeina in polvere contenuto nelle capsule di caffeina "XTRAZE – BE STRONG" del dosaggio di 200 mg ciascuna, della ditta Vitamaze.

Relativamente alle prove cognitivo-comportamentali, al soggetto sono stati somministrati diversi questionari e diverse prove. I questionari utilizzati sono stati il PANAS (Positive Affect and Negative Affect Scales) e lo STAI-Y (State-Trait Anxiety Inventory), entrambi somministrati appena prima l'assunzione della caffeina; il PANAS è, poi, stato ricompilato una seconda volta durante il corso dell'esperimento, mentre lo STAI-Y è stato nuovamente somministrato al termine dell'esperimento, prima dello smontaggio degli elettrodi. A seguito dell'assunzione di caffeina, i partecipanti hanno svolto diversi compiti che non avevano la funzione di registrare effettivamente dei dati nelle risposte comportamentali, ma piuttosto di permettere di attendere la mezz'ora necessaria perché l'eventuale caffeina somministrata facesse effetto. Al termine di questi 30 minuti, venivano somministrati al partecipante dei task controbilanciati, dai quali non è stato registrato alcun dato; l'utilizzo di questi compiti ha avuto lo scopo di impegnare il partecipante in delle attività nel corso della sua permanenza in laboratorio, in modo tale da rendere la situazione sperimentale meno alienante e più ecologica.

2.5 Procedura sperimentale

Ai partecipanti è stato chiesto di presentarsi individualmente, ad un orario precedentemente concordato; i soggetti venivano accolti e accompagnati in laboratorio, dove venivano fatti accomodare su una sedia davanti alla scrivania sulla quale era posto il computer fisso tramite il quale hanno svolto la maggior parte dei task cognitivo-comportamentali. Prima di iniziare con la procedura, i partecipanti consegnavano il foglio del consenso informato precedentemente firmato, e successivamente, veniva loro fornita una breve e chiara spiegazione della procedura di montaggio degli elettrodi e dello svolgimento dell'esperimento in generale, per assicurare e chiarificare eventuali dubbi. Una volta terminato il montaggio e verificato che tutta l'apparecchiatura funzionasse, ai partecipanti veniva chiesto di compilare due questionari, il

PANAS e lo STAI. Compilati entrambi i moduli, si passava alla somministrazione della bevanda; la bevanda consisteva di acqua e gassosa, e poteva contenere, a seconda della condizione, della caffeina solubile (200 mg) oppure dello zucchero a velo. Lo studio è stato svolto in doppio cieco, in modo da evitare qualsiasi tipo di influenza, seppur minima, sulle prestazioni dei partecipanti; per rispettare questo aspetto, una persona esterna ha preparato le bevande ogni mattina prima dell'arrivo degli sperimentatori e sono state attribuite delle etichette alle due condizioni sperimentali, nello specifico Oro (placebo) e Rosso (caffeina). Metà del campione ha assunto quindi prima la caffeina e poi il placebo, mentre l'altra metà prima il placebo e in un secondo momento la caffeina. La randomizzazione ha coinvolto la condizione sperimentale, la tipologia di protocolli somministrati (AB o BA) e la versione diversa di alcuni test.

Come si evince dalla letteratura in merito, la caffeina ha un'emivita molto breve, e raggiunge il picco a livello ematico in circa 30-45 minuti (Julien et al., 2011); dopo la somministrazione della bevanda era dunque prevista l'attesa di 30 minuti prima che la sostanza potesse fare effetto, 30 minuti durante i quali venivano svolte delle prove di intelligenza, il gioco da tavolo Tangram e dei compiti computerizzati. Nel corso di questa mezz'ora di tempo, non veniva effettuata nessuna registrazione del segnale psicofisiologico. Al termine di questo arco di tempo, i soggetti compilavano per una seconda volta il PANAS. Successivamente, si è iniziato a registrare il segnale cardiaco e la frequenza di ammiccamento; il segnale psicofisiologico è stato registrato in modo non continuo, andando a rilevare le risposte psicofisiologiche dei soggetti con registrazioni di un minuto tra un task e l'altro. Le registrazioni di un minuto che sono state effettuate tra un compito e l'altro sono state cinque. Durante queste rilevazioni, veniva chiesto ai soggetti di cercare di rimanere seduti fermi sulla sedia, in posizione comoda e non in tensione, osservando lo schermo interamente nero di fronte a sé. Al termine della quinta registrazione del segnale cardiaco e di quello di ammiccamento, al partecipante veniva chiesto di compilare per un'ultima volta lo STAI e, una volta terminato, veniva informato del fatto che l'esperimento era terminato; a questo punto si procedeva allo smontaggio degli elettrodi, offrendo alla persona la possibilità di utilizzare il bagno per pulirsi e asciugarsi dal gel conduttore apposto sulla pelle in corrispondenza degli elettrodi.

Essendo uno studio "entro i soggetti", ciascun partecipante è stato convocato per due sessioni sperimentali (S1 e S2) della durata di 1 ora e 40 circa l'una, a distanza di una settimana l'una

dall'altra e sempre allo stesso orario, così che si potesse controllare l'influenza dei ritmi circadiani e si potessero mantenere le condizioni sperimentali più possibilmente simili fra le due sessioni. Inoltre, proprio perché si è voluto tenere in considerazione i ritmi circadiani e biologici dei partecipanti, si è deciso di svolgere la ricerca solo nelle ore della mattinata, precisamente dalle 8.00 alle 14.00; alcuni studi riportano, infatti, effetti maggiormente evidenti della caffeina sull'organismo (come ad esempio nel caso della vigilanza) se somministrata nella prima parte della giornata (Fine et al., 1994).

2.6 Analisi dei dati e analisi statistica

Le analisi dei dati di questo esperimento sono state fatte utilizzando il software RStudio (RStudio Team, 2020). Le librerie utilizzate per l'analisi dei dati sono le seguenti: *tidyverse*; *lmerTest*; *lsmeans*; *ggplot2*.

Si è proceduto ad analizzare solo i dati psicofisiologici, dunque il segnale della frequenza di ammiccamento e quello della frequenza cardiaca, dal quale è stato poi ricavato anche l'indice RMSSD, misura nel dominio del tempo della variabilità della frequenza cardiaca. Il segnale è stato inizialmente controllato tramite specifici programmi creati *ad hoc* con il pacchetto LabView. Le registrazioni sono state esaminate una ad una per verificare la presenza di eventuali artefatti o problematiche con il segnale, così da poter scartare quelli che risultavano inutilizzabili. Successivamente, i segnali registrati sono stati trasformati, tramite un programma creato *ad hoc*, in valori numerici corrispondenti alla frequenza cardiaca, alla frequenza di ammiccamento e alla variabilità della frequenza cardiaca, valori su cui poter svolgere le analisi statistiche tramite Rstudio.

Per analizzare i dati raccolti è stata applicata un'analisi della varianza di tipo III (metodo di Satterthwaite) a tre vie, usando il modello lineare ad effetto misto con Intervalli e Condizione come fattori entro i soggetti. Successivamente, è stata portata avanti un'analisi post-hoc con metodo di correzione FDR (Green et al., 2007) ad ognuna di queste variabili indipendenti. Un'analisi post-hoc è stata portata avanti anche per analizzare le eventuali interazioni fra variabili, tenendo in considerazione come livello di significatività $p < .05$.

CAPITOLO 3: RISULTATI

3.1 Questionari

I punteggi ottenuti ai questionari self-report PANAS e STAI sono stati analizzati tramite l'utilizzo di *t test* per campioni appaiati, così da verificare l'eventuale esistenza di differenze tra i punteggi nelle due condizioni sperimentali, ossia la condizione Caffaina e quella Placebo. Le analisi non hanno mostrato alcuna differenza significativa dei punteggi registrati nelle due diverse condizioni. Per completezza, le tabelle seguenti riportano le medie dei punteggi in entrambe le condizioni.

PANAS: Positive Affect (PA)

	CAFFEINA	PLACEBO
T1	25.82	25.66
T2	26.53	26.45

Tabella 3.1 Media dei punteggi alla sottoscala PA del PANAS nella condizione “Caffeina” e nella condizione “Placebo”. La sigla T1 indica la prima somministrazione nel corso dell'esperimento, T2 indica la seconda.

PANAS: Negative Affect (NA)

	CAFFEINA	PLACEBO
T1	12.26	12.61
T2	12.03	13.27

Tabella 3.2 Media dei punteggi alla sottoscala NA del PANAS nella condizione “Caffeina” e nella condizione “Placebo”. La sigla T1 indica la prima somministrazione nel corso dell'esperimento, T2 indica la seconda.

STAI-Y

	CAFFEINA	PLACEBO
T1	35.32	35.85
T2	37.97	38.64

Tabella 3.3 Media dei punteggi al questionario STAI-Y nella condizione “Caffeina” e nella condizione “Placebo”. La sigla T1 indica la prima somministrazione nel corso dell’esperimento, T2 indica la seconda.

3.2 Risultati psicofisiologici

Gli indici analizzati sono stati tre: frequenza di ammiccamento (o blink rate), frequenza cardiaca e variabilità della frequenza cardiaca, nello specifico la RMSSD, ossia una misura nel dominio del tempo che rappresenta il valore quadratico medio delle differenze tra battiti cardiaci adiacenti. Tutti e tre gli indici sono stati analizzati tramite un’ANOVA mista a tre vie con due fattori entro i partecipanti: Intervallo (5 intervalli) e Condizione (Placebo o Caffeina).

3.2.1 Frequenza cardiaca

La frequenza cardiaca (FC) è stata analizzata in battiti per minuto (bpm) tramite un elettrocardiogramma (ECG) in entrambe le condizioni sperimentali (S1 e S2). E’ stata applicata un’ANOVA mista a tre vie con due fattori entro i partecipanti: Intervallo e Condizione. Nessun effetto significativo è stato riscontrato, né nel caso degli effetti principali dei singoli fattori, né nel caso delle interazioni tra i fattori.

3.2.2 Variabilità della frequenza cardiaca

Partendo dai valori della frequenza cardiaca registrati, si è risaliti alla variabilità della frequenza cardiaca (HRV); l’indice che abbiamo deciso di utilizzare è stata una misura nel dominio del tempo, la RMSSD (la radice quadrata media delle differenze tra intervalli adiacenti). Lo stesso tipo di analisi è stata fatta per analizzare anche questo indice, dunque un’ANOVA mista a tre vie con due fattori principali entro i soggetti: Intervallo e Condizione. Dall’analisi di questo indice è emerso un effetto principale del fattore Condizione ($F_{(1,236)} = 9.82, p < .01$).

Nella Figura 4.1 troviamo la rappresentazione della differenza significativa del fattore principale Condizione: possiamo osservare che la condizione Caffèina ($M = 58.1$) risulta significativamente maggiore ($< .01$) rispetto a quella Placebo ($M = 51.5$).

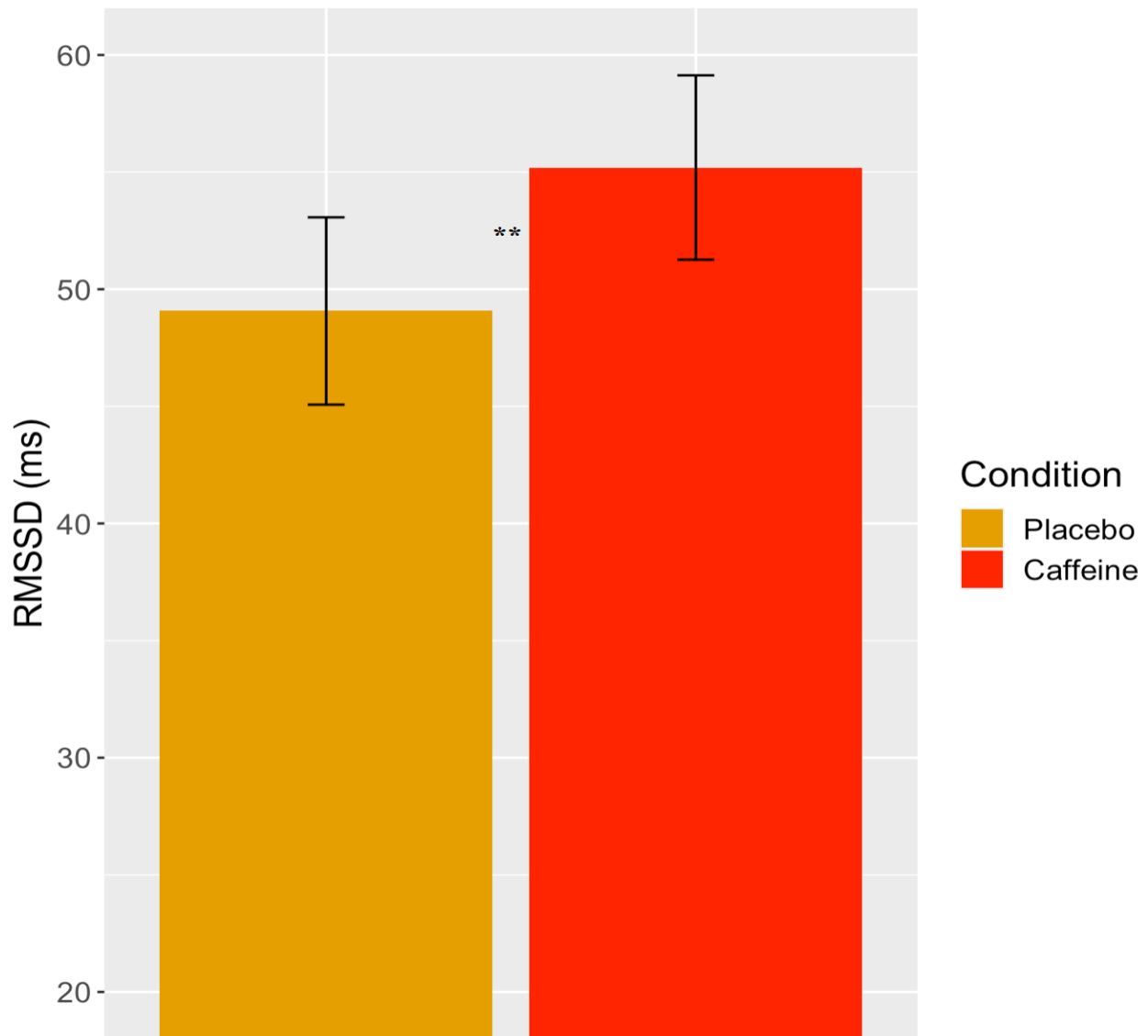


Figura 4.1 Effetto principale della Condizione sulla Variabilità della Frequenza Cardiaca. * $< .05$; ** $< .01$; *** $< .001$

3.2.3 Frequenza di ammiccamento

E' stata analizzata la frequenza di ammiccamento in battiti per minuto (bpm) tramite l'utilizzo di un elettrooculogramma verticale (vEOG) durante entrambe le condizioni sperimentali (S1 e S2),

applicando un'ANOVA mista a tre vie con due fattori entro i partecipanti: Intervallo e Condizione. Da questa analisi è emerso come statisticamente significativo solo l'effetto principale del fattore Condizione ($F_{(1,212)} = 8.21, p < .01$), mentre non è stato riscontrato alcun risultato significativo per quanto riguarda gli effetti delle interazioni tra i fattori. La Figura 4.2 rappresenta graficamente la differenza significativa riscontrata fra la condizione Placebo e la condizione Caffaina: possiamo notare come questo indice risulti maggiore nella Condizione Caffaina ($M = 17.8$), piuttosto che in quella Placebo ($M = 14.9$) ($p < .01$).

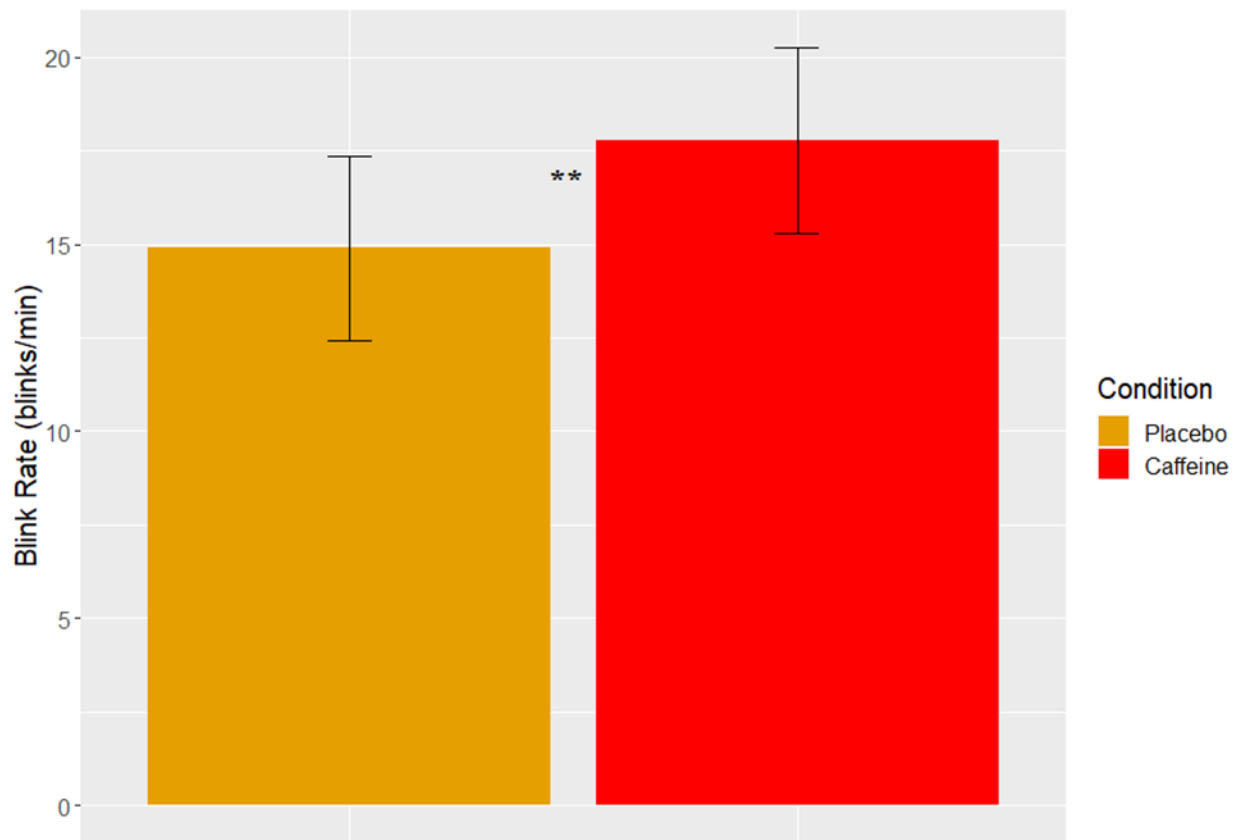


Figura 4.2 Effetto principale della Condizione sulla Frequenza di Ammiccamento. * < .05; ** < .01; *** < .001.

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1 Discussione

Questo studio è stato svolto con l'intenzione di contribuire alla letteratura già esistente relativa ai numerosi effetti che la caffeina esercita a livello fisiologico. Sono stati presi in considerazione tre indici fisiologici per poterne osservare l'eventuale modulazione da parte della caffeina: la frequenza cardiaca, la variabilità della frequenza cardiaca e la frequenza di ammiccamento. I risultati in merito ai cambiamenti esercitati dalla caffeina a livello cardiaco sono numerosi, anche se non sempre coerenti fra loro; fra le ricerche esistenti quelle che si sono concentrate sui valori della frequenza cardiaca sono un numero maggiore rispetto a quelle che hanno analizzato le variazioni della variabilità della frequenza cardiaca (Koenig et al., 2013; Turnbull et al., 2017). Una percentuale di studi molto minore, invece, ha analizzato nel corso degli anni eventuali cambiamenti registrabili a livello della frequenza di ammiccamento, ma sono pochi quelli che hanno riportato risultati significativi (Michael et al., 2008; Alozie et al., 2022). Lo scopo di questa ricerca, dunque, è stato quello di analizzare eventuali cambiamenti fisiologici causati dall'assunzione della caffeina nei confronti di queste variabili specifiche, così da poter apportare nuove conoscenze in merito alla questione. L'analisi delle variabili cardiovascolari è stata presa in considerazione così da poter produrre ulteriori dati che potessero supportare l'ipotesi prevalente in letteratura, mentre nel caso della frequenza di ammiccamento, essa è stata analizzata con lo scopo di poter eventualmente apportare nuovi risultati in un ambito poco indagato.

In base alla letteratura di riferimento e alle ipotesi di questa ricerca, dunque, ci si aspettava un cambiamento della variabilità della frequenza cardiaca, nello specifico un aumento della componente nel dominio del tempo RMSSD, la quale rappresenta l'attività parasimpatica nell'ambito del controllo cardiaco, mentre nessun cambiamento significativo era atteso per quanto riguarda la frequenza cardiaca. Un cambiamento in seguito all'assunzione di caffeina è stato ipotizzato anche nel caso della frequenza di ammiccamento: nel dettaglio, l'ipotesi prevedeva che si potesse riscontrare un aumento della frequenza di ammiccamento a riposo, in seguito all'effetto di stimolazione dopaminergica che la caffeina può causare (Nehlig, 1992; Julien et al., 2011). Nel

complesso, sono stati individuati degli effetti significativi esercitati dalla caffeina sulle risposte psicofisiologiche dei partecipanti, alcuni dei quali in linea con la letteratura esistente.

4.1.1 PANAS e STAI-Y

Ai partecipanti è stato richiesto di compilare questi due questionari relativi agli stati affettivi esperiti e all'ansia di stato in due momenti diversi dell'esperimento, immediatamente dopo la somministrazione della bevanda e più tardi nel corso dell'esperimento. E' stato deciso di integrare l'utilizzo di questi questionari per poter ricavare dati relativi allo stato emotivo esperito dai partecipanti nel corso dell'esperimento e poter analizzare, così, eventuali influenze della caffeina rispetto al placebo sull'umore e sullo stress sperimentato dai soggetti. Dalle analisi eseguite, i punteggi ottenuti ai questionari PANAS e STAI-Y non hanno dimostrato nessuna differenza significativa tra chi ha assunto caffeina e chi il placebo. I dati ottenuti in questo studio, dunque, non sembrano supportare l'idea che l'assunzione di 200 mg di caffeina possa modulare in modo significativo lo stato affettivo e lo stato di ansia percepito di una persona, per lo meno non in modo consapevole.

4.1.2 Variabili cardiovascolari

Per quanto riguarda il sistema cardiovascolare, gli indici analizzati, come già detto, sono stati due, frequenza cardiaca e variabilità della frequenza cardiaca. Un effetto significativo della caffeina è stato, però, riscontrato solamente nel caso della variabilità della frequenza cardiaca. Nel caso di questa variabile, infatti, è stato trovato un effetto principale della Condizione, ad indicare la presenza di risposte psicofisiologiche significativamente diverse nella condizione Caffeina rispetto a quella Placebo. Questi dati ci indicano che i soggetti dimostravano una maggiore variabilità della frequenza cardiaca nel caso dell'assunzione di caffeina, rispetto a quando veniva assunto un placebo. Questo risultato risulta essere in linea con la tendenza maggioritaria riscontrata dalla letteratura: un buon numero di ricerche fatte negli ultimi decenni, infatti, riporta aumenti delle componenti della variabilità della frequenza cardiaca relative all'attività vagale, dunque parasimpatica (Koenig et al., 2013; Turnbull et al., 2017), come nel caso del nostro studio. Sappiamo che la variabilità della frequenza cardiaca viene ormai considerata un indice in grado di rispecchiare l'equilibrio dinamico esistente nel controllo cardiaco fra la branca simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo (Berntson et al., 2007; Shaffer et al., 2014); un valore maggiore di

questo parametro è stato messo in relazione con una maggior capacità di autoregolazione dell'organismo e di adattabilità agli stressor psicologici e fisici (Shaffer et al., 2014). Dalla letteratura in merito emerge come una maggiore variabilità della frequenza cardiaca sia associata ad un maggior controllo vagale dell'attività cardiaca, dunque un'aumentata attività parasimpatica e questo si rispecchia in alcune componenti che possono essere analizzate sia nel dominio della frequenza che in quello del tempo, come, ad esempio, la RMSSD. Il risultato riscontrato in questo studio può essere, dunque, interpretato come una dimostrazione del fatto che la caffeina agisce a livello del sistema nervoso autonomo, stimolando un aumento dell'attività parasimpatica che si rispecchia in un maggior controllo vagale cardiaco (Waring et al., 2003). Esistono diversi studi e metanalisi recenti (Ding et al., 2014b; D'Elia et al., 2019; Borghi, 2022; Cicero et al., 2023) che stanno dimostrando come, effettivamente, il caffè possa avere un effetto rilassante a livello periferico, piuttosto che eccitante; queste ricerche hanno riportato risultati a favore dell'idea che il caffè non abbia effetti negativi a livello cardiaco e pressorio e che, anzi, sembri avere un effetto neutrale, se non addirittura benefico a livello cardiovascolare. Questo stato di rilassamento periferico che il caffè sarebbe in grado di indurre può rispecchiarsi in un aumento della variabilità della frequenza cardiaca, dato riportato da diverse ricerche (Koenig et al., 20), tra cui la presente. Alcuni ricercatori stanno attualmente ipotizzando la possibilità che la responsabilità di questi effetti benefici a livello cardiovascolare possa essere condivisa con l'azione di alcune delle altre sostanze bioattive presenti nel caffè, come, ad esempio, l'acido clorogenico (D'Elia et al., 2019; Borghi, 2022; Cicero et al., 2023), ma rimangono ipotesi che necessitano di ulteriori approfondimenti che possano chiarire l'effettivo ruolo della caffeina e delle altre sostanze in queste dinamiche. In ogni caso, sappiamo che la caffeina è la sostanza farmacologicamente più attiva presente nel caffè, quindi è facile considerare gli effetti del caffè come in grossa parte influenzati da essa. L'effetto rilassante che la caffeina può esercitare a livello periferico trova, dunque, delle prove consistenti nei dati che dimostrano un'aumentata variabilità della frequenza cardiaca in seguito alla sua assunzione e questo dato mette in crisi anche l'idea che la caffeina possa causare un aumento pressorio significativo. Il rilassamento periferico che la caffeina sembra in grado di stimolare può essere spiegato in luce di diversi fattori psicologici che intervengono; sappiamo, infatti, che piccole quantità di questa sostanza stimolante migliorano il benessere percepito di una persona, il suo senso di autoefficacia e la lucidità nell'affrontare un compito o un lavoro e questi effetti possono avere un peso sul rilas-

samento periferico indotto dalla caffeina, in quanto ci permettono di affrontare un eventuale compito o situazione percependo meno stress e in modo più ottimista e rilassato. Questi cambiamenti a livello psicologico possono avere degli effetti a cascata a livello cardiovascolare, facendo sì che non ci sia un eventuale innalzamento della pressione causato dall'ansia.

Altro risultato coerente con le conoscenze già esistenti è stato quello individuato nel caso della frequenza cardiaca; in questo studio, infatti, nessun cambiamento significativo è risultato tra la Condizione Caffeina e quella Placebo, ad indicare un'influenza non significativa dell'assunzione di caffeina nei confronti della frequenza cardiaca. Questo risultato, come detto, è in linea con quanto riportato in letteratura; molti studi esistenti, infatti, non hanno identificato cambiamenti significativi in seguito alla somministrazione di caffeina, anche se esistono alcune ricerche che hanno, invece, riportato delle variazioni in entrambe le direzioni. Tra gli studi che hanno riportato cambiamenti, la maggior parte sembra indicare una leggera diminuzione; un'ipotesi formulata per spiegare questi dati prevede che questa diminuzione potrebbe esser legata ad un'aumentata attività dei barocettori in risposta all'aumento pressorio che la caffeina può causare (Sondermeijer et al., 2002). In ogni caso, la maggioranza dei dati a disposizione sembra essere in linea con il risultato qui riscontrato, a dimostrazione del fatto che la caffeina esercita pochi effetti, se non addirittura alcun effetto, a livello della frequenza cardiaca. I nostri risultati sono, dunque, coerenti con la maggioranza della letteratura ed è interessante notare come, se da un lato questi dati possano essere interpretati basandosi sulla tesi di chi supporta un effetto dell'azione dei riflessi barocettivi, in realtà, questo risultato, unito all'aumentata variabilità della frequenza cardiaca riscontrata, supporta l'idea che la caffeina non abbia effetti stimolanti a livello periferico e cardiovascolare.

4.1.3 Frequenza di ammiccamento

Diverso è il caso della frequenza di ammiccamento; come detto, infatti, in letteratura i risultati sono scarsi, ma volendo prendere in considerazione i pochi studi che hanno riscontrato degli effetti in seguito all'assunzione di caffeina, essi hanno individuato una diminuzione di questo indice. Questi studi, però, prevedevano diverse condizioni sperimentali, nelle quali i soggetti erano impegnati in dei compiti di vigilanza volti a misurare i tempi di reazione (Michael et al., 2008) oppure in una conversazione (Alozie et al., 2022). In questa ricerca, i risultati hanno mostrato un effetto principale della Condizione, dunque delle risposte psicofisiologiche diverse tra la condizione Caffeina rispetto a quella Placebo, ma il cambiamento riportato è stato, piuttosto, un

aumento della frequenza di ammiccamento nel caso del consumo di caffeina. Nonostante il risultato qui riscontrato sia differente da quelli appena citati, ciò non è necessariamente contrario alle conoscenze che possediamo in merito a questo indice; infatti, nel caso di questa ricerca, la frequenza di ammiccamento è stata registrata in situazioni di quiete, con i soggetti che sedevano fermi guardando uno schermo nero di fronte a sé, e non erano dunque impegnati in nessun tipo di compito che potesse influenzare l'andamento della frequenza di ammiccamento. Quindi, nel caso della nostra ricerca, l'aumento riscontrato in seguito alla somministrazione di caffeina è un risultato coerente con la nostra ipotesi di partenza e con la nozione esistente in letteratura in merito al fatto che sia la caffeina che la frequenza di ammiccamento sembrano essere correlate all'attività dopaminergica. Sappiamo, infatti, che la frequenza di ammiccamento mostra una correlazione di tipo positivo con l'attività dopaminergica a riposo (Jongkees e Colzato, 2016) e che la caffeina causa una debole azione di stimolazione indiretta dei centri dopaminergici dello striato (Nehlig et al., 1992; Nawrot et al., 2003; Julien et al., 2011); l'aumentata attività dopaminergica causata dall'assunzione della caffeina potrebbe, dunque, stimolare una maggiore frequenza di ammiccamento in una condizione nella quale essa non subisce interferenze da parte di altre attività cognitive, come nel caso di uno stato di riposo.

4.2 Conclusioni

In conclusione, questa ricerca ha riscontrato alcuni risultati in linea con la tendenza maggioritaria esistente in letteratura: è stato infatti provato, anche in questo studio, come l'assunzione di caffeina sembri in grado di influenzare, aumentandola, l'attività del sistema nervoso autonomo parasimpatico, fatto dimostrato da un aumento del parametro nel dominio del tempo RMSSD, che rappresenta quindi un aumento della variabilità della frequenza cardiaca, dunque un aumento dell'attività vagale nel controllo cardiaco. Anche l'assenza di cambiamenti significativi riscontrata a livello della frequenza cardiaca è in linea con la letteratura esistente. A causa di una scarsità di ricerche in merito, non ha un effettivo riscontro in letteratura, invece, il risultato relativo alla frequenza di ammiccamento, che in questo studio è risultata essere aumentata dalla somministrazione di caffeina. Quest'ultimo risultato, però, per quanto non comunemente riportato da studi che hanno analizzato le variazioni della frequenza di ammiccamento in seguito all'assunzione di caffeina, trova comunque una spiegazione coerente con le conoscenze esistenti

in merito; l'aumentata attività dei centri dopaminergici dello striato causata dalla caffeina potrebbe, infatti, essere alla base dell'aumento della frequenza di ammiccamento a riposo.

Questo studio si inserisce nella vasta letteratura già esistente in merito agli effetti della caffeina a livello cardiovascolare, confermandone la capacità di aumentare la variabilità della frequenza cardiaca, dato in linea con l'idea che la caffeina abbia un effetto rilassante a livello periferico e cardiovascolare. Inoltre, l'aumento della frequenza di ammiccamento individuato in seguito al consumo di caffeina è un buon fattore a riprova del ruolo che l'attività dopaminergica gioca nell'azione di ammiccamento e di come questa attività centrale possa essere modulata dalla caffeina. In generale, i risultati riscontrati in questa ricerca confermano il fatto che la caffeina può causare un arousal a livello centrale, tramite una debole stimolazione dell'attività dopaminergica fronto-striatale, ma non ha lo stesso effetto a livello periferico; questa sostanza dimostra, infatti, un'azione rilassante a livello periferico, come il dato relativo all'aumento dell'attività vagale nel controllo cardiaco ben dimostra.

Un aspetto da tenere in considerazione riguarda le differenze interindividuali che possono influire sugli effetti della caffeina; questo studio non si è focalizzato su di esse, preferendo l'analisi di un campione generale, ma, come già suggeriscono diverse metanalisi in merito, sarebbe interessante per studi futuri tenere in considerazione diversi aspetti legati a queste differenze che possono modulare gli effetti legati al consumo di caffeina, quali differenze fra generi diversi, oppure fra consumatori abituali e non, oltre che i possibili effetti della tolleranza e dell'astinenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Abdulmunem, M. (1999). Relation between tear breakup time and spontaneous blink rate. *International Contact Lens Clinic*, 26(5), 117.
2. Alozie, A. C., Ahanna, U. U., Chikezie, I. G., Samuel, I. U., & Ifeanyi, F. O. (2022). Effect of caffeine (coffee) on blink rates of adults during conversation. *Acta Scientifica Ophthalmology*, 5(3), 3-13.
3. Ascherio, A., & Chen, H. (2003). Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 61(11 Suppl 6), S51-S54.
4. Ascherio, A., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Calle, E. E., Rodriguez, C., & Thun, M. J. (2004). Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 977-984.
5. Bagley, J., & Manelis, L. (1979). Effects of awareness on an indicator of cognitive load. *Perceptual and motor skills*, 49(2), 591-594.
6. Barbato, G., della Monica, C., Costanzo, A., & De Padova, V. (2012). Dopamine activation in neuroticism as measured by spontaneous eye blink rate. *Physiology and Behavior*, 105(2), 332-336.
7. Barone, J. J., & Roberts, H. R. (1996). Caffeine consumption. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 119-129.
8. Basso, M. A., & Evinger, C. (1996). An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. II. Nucleus raphe magnus. *Journal of Neuroscience*, 16(22), 7318-7330.
9. Benowitz, N. L. (1990). Clinical pharmacology of caffeine. *Annual Review of Medicine*, 41, 277-288.
10. Bentivoglio, A., Bressman, S. B., Cassetta, E., Carretta, D., Tonali, P., & Albanese, A. (1997). Analysis of blink patterns in normal subjects. *Movement Disorders*, 12(6), 1028-1034.
11. Berntson, G. G., Bigger, J. T., Jr, Eckberg, D. L., Grossman, P., Kaufmann, P. G., Malik, M., Nagaraja, H. N., Porges, S. W., Saul, J. P., Stone, P. H., & van der Molen, M. W. (1997). Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology*, 34(6), 623-648.
12. Berntson, G. G., Quigley, K. S., & Lozano, D. (2007). "Cardiovascular Psychophysiology" in *Handbook of Psychophysiology*, eds. J. T. Cacioppo, L. G. Tassinary & G. G. Berntson (New York, NY: Cambridge University Press), 182-210.
13. Berntson, G. G., Norman, G. J., Hawkey, L. C., & Cacioppo, J. T. (2008). Cardiac autonomic balance vs. cardiac regulatory capacity. *Psychophysiology*, 45(4), 643-652.
14. Billman, G. E. (2013). The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympathovagal balance. *Frontiers in Physiology*, 4, 26.
15. Billman, G. E., Huikuri, H. V., Sacha, J., & Trimmel, K. (2015). An introduction to heart rate variability: methodological considerations and clinical applications. *Frontiers in Physiology*, 6(55).
16. Blount, W. P. (1928). Studies of the movements of the eyelids of animals: blinking. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 18, 111-125.

17. Bocca, M. L., & Denise, P. (2006). Total sleep deprivation effect on disengagement of spatial attention as assessed by saccadic eye movements. *Clinical Neurophysiology*, 117(4), 894-899.
18. Boere, J. J., Fellingner, L., Huizinga, D. J. H., Wong, S. F., & Bijleveld, E. (2016). Performance pressure and caffeine both affect cognitive performance, but likely through independent mechanisms. *Brain and Cognition*, 102, 26-32.
19. Bonnet, M., Tancer, M., Uhde, T., & Yeragani, V. K. (2005). Effects of caffeine on heart rate and QT variability during sleep. *Depression and Anxiety*, 22(3), 150-155.
20. Borghi, C. (2022). Coffee and blood pressure: exciting news! *Blood Pressure*, 31(1), 284-287.
21. Browne, M. L. (2006). Maternal exposure to caffeine and risk of congenital abnormalities: a systematic review. *Epidemiology*, 17(3), 324-331.
22. Caffier, P. P., Erdmann, U., & Ullsperger, P. (2003). Experimental evaluation of eye-blink parameters as a drowsiness measure. *European Journal of Applied Physiology*, 89, 319-325.
23. CARE Study Group. (2008). Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *British Medical Journal*, 337, a2332.
24. Carpenter, A. (1948). The rate of blinking during prolonged visual search. *Journal of Experimental Psychology*, 38(5), 587-591.
25. Carter, B. T., & Luke, S. G. (2020). Best practices in eye tracking research. *International Journal of Psychophysiology*, 155(3), 49-62.
26. Chermahini, S. A., & Hommel, B. (2010). The (b)link between creativity and dopamine: spontaneous eye blink rates predict and dissociate divergent and convergent thinking. *Cognition*, 115(3), 458-465.
27. Critchley, H. D., Rotshtein, P., Nagai, Y., O'Doherty, J., Mathias, C. J., & Dolan, R. J. (2005). Activity in the human brain predicting differential heart rate responses to emotional facial expressions. *Neuroimage*, 24(3), 751-762.
28. Cicero, A. F. G., Fogacci, F., D'Addato, S., Grandi, E., Rizzoli, E., & Borghi, C. (2023). Self-reported coffee consumption and central and peripheral blood pressure in the cohort of the Brisighella Heart Study. *Nutrients*, 15(2), 312-322.
29. Cornelis, M. C., El-Sohemy, A., Kabagambe, E. K., & Campos, H. (2006). Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *Journal of American Medical Association*, 295(10), 1135-1141.
30. Corrao, G., Zambon, A., Bagnardi, V., D'Amicis, A., & Klatsky, A.; Collaborative SIDECIR Group. (2001). Coffee, caffeine, and the risk of liver cirrhosis? *Annals of Epidemiology*, 11(7), 458-465.
31. Creel, D. J. (2019). The electrooculogram. *Handbook of Clinical Neurology*, 160, 495-499.
32. Daza, R., Morales, A., Fierrez, J., & Tolosana, R. (2020). mEBAL: a multimodal database for eye blink detection and attention level estimation. *ICMI '20 Companion: Companion Publication of the 2020 International Conference on Multimodal Interaction*, pp. 32-36.
33. D'Elia, L., La Fata, E., Galletti, F., Scalfi, L., & Strazzullo, P. (2019). Coffee consumption and risk of hypertension: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Nutrition*, 58, 271-280.

34. Dews, P. B. (1982). Caffeine. *Annual Review of Nutrition.*, 2, 323-341.
35. Ding, M., Bhupathiraju, S. N., Chen, M., van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2014a). Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systemic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care*, 37(2), 569-586.
36. Ding, M., Bhupathiraju, S. N., Satija, A., van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2014b). Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease. A systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation*, 129(6), 643-659.
37. Domotor, Z., Szemerszky, R., & Koteles, F. (2015). Subjective and objective effects of coffee consumption – Caffeine or expectations? *Acta Physiologica Hungarica*, 102(1), 77-85.
38. Doughty, M. J. (2001). Consideration of three types of spontaneous eyeblink activity in normal humans: during reading and video display terminal use, in primary gaze, and while in conversation. *Optometry and vision science*, 78(10), 712-725.
39. Drew, G. C. (1951). Variations in reflex blink-rate during visual-motor tasks. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 3(2), 73-88.
40. Ebert, D., Albert, R., Hammon, G., Strasser, B., May, A., & Merz, A. (1996). Eye-blink rates and depression. Is the antidepressant effect of sleep deprivation mediated by the dopamine system? *Neuropsychopharmacology*, 15(4), 332-339.
41. Eckberg, D. L., & Eckberg, M. J. (1982). Human sinus node responses to repetitive ramped carotid baroreceptor stimuli. *American Journal of Physiology*, 242(4), H638-H644.
42. Eckberg, D. L. (1998). Sympathovagal balance: a critical appraisal. Reply. *Circulation*, 98, 2643-2644.
43. Evinger, C. (1995). A brainstem reflex in the blink of an eye. *Physiology*, 10(4), 147-153.
44. Ewing, D. J., Campbell, I. W., & Clarke, B. F. (1976). Mortality in diabetic autonomic neuropathy. *The Lancet*, 1(7960), 601-603.
45. Ferré, S. (2008). An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of neurochemistry*, 105(4), 1067-1079.
46. Fine, B. J., Kobrick, J. L., Lieberman, H. R., Marlowe, B., Riley, R. H., & Tharion, W. J. (1994). Effects of caffeine or diphenhydramine on visual vigilance. *Psychopharmacology*, 114(2), 233-238.
47. Fogarty, C., & Stern, J. A. (1989). Eye movements and blinks: their relationship to higher cognitive processes. *International Journal of Psychophysiology*, 8(1), 35-42.
48. Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 83-133.
49. Gianaros, P. J., May, J. C., Siegle, G. J., & Jennings, R. (2005). Is there a functional neural correlate of individual differences in cardiovascular reactivity? *Psychosomatic Medicine*, 67(1), 31-39.
50. Gocken, B. B., Sanlier, N. (2019). Coffee consumption and disease correlations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(2), 336-348.
51. Green, G. H., & Diggle, P. J. (2007). On the operational characteristics of the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate procedure. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 6(1).
52. Green, P. J., Kirby, R., & Suls, J. (1996). The effects of caffeine on blood pressure and heart rate: a review. *Annals of Behavioral Medicine*, 18(3), 201-216.

53. Greenberg, J. A., Boozer, C. N., & Geliebter, A. (2006). Coffee, diabetes, and weight control. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 682-693.
54. Grossman, P., & Taylor, E. W. (2007). Towards understanding respiratory sinus arrhythmia: relations to cardiac vagal tone, evolution and biobehavioral functions. *Biological Psychology*, 74(2), 263-285.
55. Gunter, M. J., Murphy, N., Cross, A. J., Dossus, L., Dartois, L., Fagherazzi, G., Kaaks, R., Kuhn, T., Boeing, H., Aleksandrova, K., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Larsen, S. C., Cornejo, M. L. R., Agudo, A., Pérez, M. J. S., Altzibar, J. M., Navarro, C., Ardanaz, E., et al. (2017). Coffee drinking and mortality in 10 European countries: a multinational cohort study. *Annals of Internal Medicine*, 167(4), 236-247.
56. Haider, E., & Rohmert, W. (1976). *Blink frequency during four hours of simulated truck driving*. *European Journal of Applied Psychology*. 35, 137-147.
57. Hall, A. (1945). The origin and purposes of blinking. *British Journal of Ophthalmology*, 29(9), 445-467.
58. Harland, B. F. (2000). Caffeine and nutrition. *Nutrition*, 16(7-8), 522-526.
59. Heaney, R. P. (2002). Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food and Chemical Toxicology*, 40(9), 1263-1270.
60. Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F., & Gestal-Otero, J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 52(3), 276-284.
61. Hibino, G., Moritani, T., Kawada, T., & Fushiki, T. (1997). Caffeine enhances modulation of parasympathetic nerve activity in humans: quantification using power spectral analysis. *Journal of Nutrition*, 127(7), 1422-1427.
62. Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(2), 101-123.
63. Hill, L. K., Siebenbrock, A., Sollers, J. J., & Thayer, J. F. (2009). Are all measures created equal? Heart rate variability and respiration. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 45, 71-76.
64. Hirsch, J. A., & Bishop, B. (1981). Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *American Journal of Physiology*, 241(4), H620-H629.
65. Holland, M. K., & Tarlow, G. (1972). Blinking and mental load. *Psychological Reports*, 31(1), 119-127.
66. Holland, M. K., & Tarlow, G. (1975). Blinking and thinking. *Perceptual and Motor Skills*, 41(2), 503-506.
67. Hon, E. H., & Lee, S. T. (1963). Electronic evaluation of the fetal heart rate. VIII. Patterns preceding fetal death, further observations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 87, 814-826.
68. Horne, J. A., & Reyner, L. A. (1996). Counteracting drive sleepiness: effects of napping, caffeine, and placebo. *Psychophysiology*, 33(3), 306-309.
69. Hyo, W. Y., Chung, J. Y., Song, M. S., & Park, H. (2005). Neural correlates of eye blinking; improved by simultaneous fMRI and EOG measurement. *Neuroscience Letters*, 381(1-2), 26-30.
70. Jahanfar, S., & Sharifah, H. (2009). Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 15(2), CD006965.

71. Jee, S. H., He, J., Appel, L. J., Whelton, P. K., Suh, I., & Klag, M. J. (2001). Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *American Journal of Epidemiology*, 153(4), 353-362.
72. Jongkees, B. J., & Colzato, L. S. (2016). Spontaneous eye blink rate as predictor of dopamine-related cognitive function – A review. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 71, 58-82.
73. Juliano, L. M., & Griffiths, R. R. (2004). A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology*, 176(1), 1-29.
74. Julien, R. M., Advokat, C. D., & Comaty, J. E. (2011). A primer of drug action (12th ed). Worth Publishers.
75. Kammer, J., Powers, A. S., Horn, K. G., Hui, C., & Evinger, C. (2011). Characterizing the spontaneous blink generator: an animal model. *Journal of Neuroscience*, 31(31), 11256-11267.
76. Karapetian, G. K., Engels, H. J., Gretebeck, K. A., & Gretebeck, R. J. (2012). Effect of caffeine on LT, VT and HRVT. *International Journal of Sports Medicine*, 33(12), 507-513.
77. Karson, C. N. (1983). Spontaneous eye blink rates and dopaminergic systems. *Brain*, 106(3), 643-653.
78. Kim, Y., Je, Y., & Giovannucci, E. (2019). Coffee consumption and all-cause and cause-specific mortality: a meta-analysis by potential modifiers. *European Journal of Epidemiology*, 34(8), 731-752.
79. Kleiger, R. E., Stein, P. K., & Bigger, J. T., Jr. (2005). Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, 10(1), 88-101.
80. Koenig, J., Jarczok, M. N., Kuhn, W., Morsch, K., Schäffer, A., Hillecke, T. K., & Thayer, J. F. (2013). Impact of caffeine on heart rate variability: a systematic review. *Journal of Caffeine Research*, 3(1), 22-37.
81. Laborde, S., Mosley, E., & Thayer, J. F. (2017). Heart rate variability and cardiac vagal tone in psychophysiological research – Recommendations for experiment planning, data analysis, and data reporting. *Frontiers in psychology*, 8(213).
82. Ladas, A., Frantzidis, C., Bamidis, P., & Vivas, A. B. (2014). Eye blink rate as a biological marker of mild cognitive impairment. *International Journal of Psychophysiology*, 93(1), 12-16.
83. Lane, R. D., Reiman, E. M., Ahern, G. L. & Thayer, J. F. (2001). Activity in medial prefrontal cortex correlates with vagal component of heart rate variability during emotion. *Brain and Cognition*, 47(1), 97-100.
84. Lehrer, P. (2013). How does heart rate variability biofeedback work? Resonance, the baroreflex, and other mechanisms. *Biofeedback*, 41(1), 26-31.
85. Li, Q., Liu, Y., Sun, X., Yin, Z., Li, H., Cheng, C., Liu, L., Zhang, R., Liu, F., Zhou, Q., Wang, C., Li, L., Wang, B., Zhao, Y., Zhang, M., & Hu, D. (2019). Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of all-cause mortality: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 32(3), 279-287.
86. Linnet, K. M., Wisborg, K., Secher, N. J., Thomsen, P. H., Oberl, C., Dalsgaard, S., & Henriksen, T. B. (2009). Coffee consumption during pregnancy and the risk of hyperkinetic disorder and ADHD: a prospective cohort study. *Acta Paediatrica*, 98(1), 173-179.

87. Lovallo, W. R., Wilson, M. F., Vincent, A. S., Sung, B. H., McKey, B. S., & Whitsett, T. L. (2004). Blood pressure response to caffeine shows incomplete tolerance after short-term regular consumption. *Hypertension*, 43(4), 760-765.
88. Maffei, A., & Angrilli, A. (2018). Spontaneous eye blink rate: an index of dopaminergic component of sustained attention and fatigue. *International Journal of Psychophysiology*, 123, 58-63.
89. Maffei, A., & Angrilli, A. (2019). Spontaneous blink rate as an index of attention and emotion during film clips viewing. *Physiology and Behavior*, 204, 256-263.
90. Magkos, F., & Kavouras, S. A. (2005). Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(7-8), 535-562.
91. Mandel, H. G. (2002). Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food and Chemical Toxicology*, 40(9), 1231-1234.
92. Martins, R., & Carvalho, J. M. (2015). Eye blinking as an indicator of fatigue and mental load – A systematic review. In *Occupational Safety and Hygiene III*, eds., P. M. Arezes, J. S. Baptista, M. P. Barroso, P. Carneiro, P. Corderio, N. Costa, R. B. Melo, A. S., Miguel, & G. Perestrelo (CRC Press), 231-235.
93. Matsuo, F., Peters, J. F., & Reilly, E. L. (1975). Electrical phenomena associated with movements of the eyelid. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 38(5), 507-511.
94. McCraty, R., Atkinson, M., Tomasino, D., & Bradley, R. T. (2009). The coherent heart. Heart-brain interactions, psychophysiological coherence, and the emergence of system-wide order. *Integral Review*, 5(2), 10-115.
95. McCraty, R. & Childre, D. (2010). Coherence: bridging personal, social, and global health. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 16(4), 10-24.
96. McIntire, L. K., McKinley, R. A., Goodyear, C., & McIntire, J. P. (2014). Detection of vigilance performance using eye blinks. *Applied Ergonomics*, 45(2B), 354-362.
97. McMonnies, C. W. (2010). Blinking mechanisms. *Encyclopedia of the Eye*, pp. 202-208.
98. Michael, N., Johns, M., Owen, C., & Patterson, J. (2008). Effects of caffeine on alertness as measured by infrared reflectance oculography. *Psychopharmacology*, 200(2), 255-260.
99. Minzhong, Y., Russo, M., Johnson, D., & Kamimori, G. (2004). Oculomotor measures over 30-hours of continuous wake with and without caffeine. *Sleep*, 27(Suppl), A138.
100. Monda, M., Viggiano, Am., Vicidomini, C., Viggiano, Al., Iannaccone, T., Tafari, D., & De Luca, B. (2009). Espresso coffee increases parasympathetic activity in young, healthy people. *Nutritional Neuroscience*, 12(1), 43-48.
101. Morris, T. L., & Miller, J. C. (1996). Electrooculographic and performance indices of fatigue during simulated flight. *Biological Psychology*, 42(3), 343-360.
102. Müller, J., Dreisbach, G., Brocke, B., Lesch, K. P., Strobel, A. & Goschke, T. (2007). Dopamine and cognitive control: the influence of spontaneous eyeblink rate, DRD4 exon III polymorphism and gender on flexibility in set-shifting. *Brain Research*, 1131(1), 155-162.
103. Myers, M. G. (1992). Cardiovascular effects of caffeine. *Canadian Family Physician*, 38, 1459-1462.
104. Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*, 20(1), 1-30.

105. Nehlig, A., Daval, J. L., Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17(2), 139-170.
106. Nieoullon, A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, 67(1), 53-83.
107. Nishijima, Y., Ikeda, T., Takamatsu, M., Kiso, Y., Shibata, H., Fushiki, T., & Moritani, T. (2002). Influence of caffeine ingestion on autonomic nervous activity during endurance exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 87(6), 475-480.
108. Noordzij, M., Uiterwaal, C. S. P. M., Arends, L. R., Kok, F. J., Grobbee, D. E., & Geleijnse, J. M. (2005). Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Hypertension*, 23(5), 921-928.
109. Notarius, C. F., & Floras, J. S. (2012). Caffeine enhances heart rate variability in middle-aged healthy, but not heart failure subjects. *Journal of Caffeine Research*, 2(2), 77-82.
110. Oh, J., Jeong, S. Y., & Jeong, J. (2012). The timing and temporal patterns of eye blinking are dynamically modulated by attention. *Human Movement Science*, 31(6), 1353-1365.
111. Paprocki, R., & Lenskiy, A. (2017). What does eye-blink rate variability dynamics tell us about cognitive performance? *Frontiers in Human Neuroscience*, 11(620).
112. Penttillä, J., Helminen, A., Jartti, T., Kuusela, T., Huikuri, H. V., Tulppo, M. P., Coffeng, R., & Scheinin, H. (2001). Time domain, geometrical and frequency domain analysis of cardiac vagal outflow: effects of various respiratory patterns. *Clinical Physiology*, 21(3), 365-376.
113. Pollack, A. Z., Louis, G. M. B., Sundaram, R., & Lum, K. J. (2010). Caffeine consumption and miscarriage: a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 93(1), 304-306.
114. Ponder, E., & Kennedy, W. P. (1927). On the act of blinking. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 18(2), 89-110.
115. Porges, S. W. (2007). The polyvagal perspective. *Biological Psychology*, 74(2), 116-143.
116. Poulton, E. C., & Gregory, R. L. (1952). Blinking during visual tracking. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 4(2), 57-65.
117. Quintana, D. S., & Heathers, J. A. J. (2014). Considerations in the assessment of heart rate variability in biobehavioral research. *Frontiers in psychology*, 5(805).
118. Ranti, C., Jones, W., Klin, A., & Shultz, S. (2020). Blink rate patterns provide a reliable measure of individual engagement with scene content. *Scientific Reports*, 10(8267).
119. Rauh, R., Burkert, M., Siepmann, M., & Mueck-Weymann, M. (2006). Acute effects of caffeine on heart rate variability in habitual caffeine consumers. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 26(3), 163-166.
120. Reyes Del Paso, G. A., Langewitz, W., Mulder, L. J. M., van Roon, A., & Duschek, S. (2013). The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: a review with emphasis on a reanalysis of previous studies. *Psychophysiology*, 50, 477-487.

121. Richardson, T., Baker, J., Thomas, P. W., Meckes, C., Rozkovec, A., & Kerr, D. (2009). Randomized control trial investigating the influence of coffee on heart rate variability in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *QJM*, 102(8), 555-561.
122. Richardson, T., Rozkovec, A., Thomas, P., Ryder, J., Meckes, C., & Kerr, D. (2004). Influence of caffeine on heart rate variability in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 27(5), 1127-1131.
123. Robertson, D., Frolich, J. C., Carr, R. K., Watson, J. T., Hollifield, J. W., Shand, D. G., & Oates, J. A. (1978). Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *New England Journal of Medicine*, 298(4), 181-186.
124. Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovich, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., Tanner, C. M., Msaki, K. H., Blanchette, P. L., Curb, J. D., Popper, J. S., & White, L. R. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, 283(20), 2674-2679.
125. Ruhl, C. E., & Everhart, J. E. (2005). Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*, 128(1), 24-32.
126. Satel, S. (2006). Is caffeine addictive? – A review of the literature. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 32(4), 493-502.
127. Sattin, A., & Rall, T. W. (1970). The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Molecular Pharmacology*, 6(1), 13-23.
128. Sawynok, J. (1995). Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs*, 49(1), 37-50.
129. Schipke, J. D., Arnold, G., & Pelzer, M. (1999). Effect of respiration rate on short-term heart rate variability. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 2(1), 92-95.
130. Shaffer, F., & Venner, J. (2013). Heart rate variability anatomy and physiology. *Biofeedback*, 41(1), 13-25.
131. Shaffer, F., McCraty, R., & Zerr, C. L. (2014). A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. *Frontiers in psychology*, 5(1040).
132. Smith, A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 40(9), 1243-1255.
133. Smith, A., Brice, C., Nash, J., Rich, N., & Nutt, D. J. (2003). Caffeine and central noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function. *Journal of Psychopharmacology*, 17(3), 283-292.
134. Smith, A., Sutherland, D., & Christopher, G. (2005). Effects of repeated doses of caffeine on mood and performance of alert and fatigued volunteers. *Journal of Psychopharmacology*, 19(6), 620-626.
135. Sondermeijer, H. P., van Marle, A. G. J., Kamen, P., & Krum, H. (2002). Acute effects of caffeine on heart rate variability. *American Journal of Cardiology*, 90(8), 906-907.
136. Spielberger, C. D. (1989). "S.T.A.I. (State-Trait Anxiety Inventory). Inventario per l'ansia di stato e di tratto: nuova versione italiana dello S.T.A.I., forma Y: manuale". *Organizzazioni Speciali*, Firenze.

137. Stern, J. A., Walrath, L. C., & Goldstein, R. (1984). The endogenous eyeblink. *Psychophysiology*, 21(1), 22-33.
138. Stern, J. A., Boyer, D., & Schroeder, D. (1994). Blink rate: a possible measure of fatigue. *Human Factors*, 36(2), 285-297.
139. Stevens, J. R. (1978). Eye blink and schizophrenia: psychosis or tardive dyskinesia? *American Journal of Psychiatry*, 135(2), 223-226.
140. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*, 93(5), 1043-1065.
141. Ter Horst, G. J., Hautvast, R. W. M., Jongste, M. J. L., & Korf, J. (1996). Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 8(10), 2029-2041.
142. Terracciano, A., McCrae, R. R., & Costa, P. T., Jr (2003). Factorial and construct validity of the Italian Positive and Negative Affect Schedule (PANAS). *European Journal of Psychological Assessment*, 19(2), 131-141.
143. Thayer, J. F., Hansen, A. L., Saus-Rose, E., & Johnsen, B. H. (2009). Heart rate variability, prefrontal neural function, and cognitive performance: the neurovisceral integration perspective on self-regulation, adaptation, and health. *Annals of Behavioral Medicine*, 37(2), 141-153.
144. Thayer, J. F., Yamamoto, S. S., & Brosschot, J. F. (2010). The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *International Journal of Cardiology*, 141(2), 122-131.
145. Turnbull, D., Rodricks, J. V., Mariano, G. F., & Chowdhury, F. (2017). Caffeine and cardiovascular health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 165-185.
146. Tverdal, A., & Skurtveit, S. (2003). Coffee intake and mortality from liver cirrhosis. *American Journal of Epidemiology*, 13(6), 419-423.
147. Ulanovsky, I., Haleluya, N. S., Blazer, S., & Weissman, A. (2014). The effects of caffeine on heart rate variability in newborns with apnea of prematurity. *Journal of Perinatology*, 34(8), 620-623.
148. Umetani, K., Singer, D. H., McCraty, R., & Atkinson, M. (1998). Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *Journal of the American College of Cardiology*, 31(3), 593-601.
149. van Dam, R. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Stehouwer, C. D. A., Bouter, L. M., & Heine, R. J. (2004). Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia*, 47(12), 2152-2159.
150. van Dam, R. M., Hu, F. B., Willett, W. C. (2020). Coffee, caffeine, and health. *The New England Journal of Medicine*, 383(4), 369-378.
151. Waring, W. S., Goudsmit, J., Marwick, J., Webb, D. J., & Maxwell, S. R. (2003). Acute caffeine intake influences central more than peripheral blood pressure in young adults. *American Journal of Hypertension*, 16(11), 919-924.
152. Watson, D., Clark, L. A., & Tellegen, A. (1988). Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *Journal of personality and social psychology*, 54(6), 1063.

153. Wiklund, U., Karlsson, M., Ostrom, M., & Messner, T. (2009). Influence of energy drinks and alcohol on post-exercise heart rate recovery and heart rate variability. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 29(1), 74-80.
154. Yeragani, V. K., Krishnan, S., Engels, H. J., & Gretebeck, R. (2005). Effects of caffeine on linear and nonlinear measures of heart rate variability before and after exercise. *Depression and Anxiety*, 21(3), 130-134.
155. Zametkin, A. J., Stevens, J. R., & Pittman, R. (1979). Ontogeny of spontaneous blinking and habituation of the blink reflex. *Annals of Neurology*, 5(5), 453-457.
156. Zimmermann-Viehoff, F., Thayer, J., Koenig, J., Herrmann, C., Weber, C. S., & Deter, H.C. (2016). Short-term effects of espresso coffee on heart rate variability and blood pressure in habitual and non-habitual coffee consumers – A randomized crossover study. *Nutritional Neuroscience*, 19(4), 169-175.