



**DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA - FARMÀCIA**

**DISSOCIACIÓ DELS RITMES CIRCADIARIS I TRACTAMENTS PER AL  
SEU ACOBLAMENT EN RATES SOTMESES A CICLES DE LLUM-FOSCOR  
DE 22 I 23 HORES**

Montserrat Anglès Pujolràs

2007





**DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA - FARMÀCIA**

Programa de Doctorat:  
**MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT**

Bienni 2003/2005

**DISSOCIACIÓ DELS RITMES CIRCADIARIS I TRACTAMENTS PER AL  
SEU ACOBLAMENT EN RATES SOTMESES A CICLES DE LLUM-FOSCOR  
DE 22 I 23 HORES**

Memòria presentada per Montserrat Anglès Pujolràs per optar al títol de Doctor  
per la Universitat de Barcelona

Directora:

Dra. Trinitat Cambras Riu

Doctoranda:

Montserrat Anglès Pujolràs

2007





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Fisiologia (Farmàcia)**

Facultat de Farmàcia  
Edifici B, escala A, 3a planta  
Av. Joan XXIII s/n  
08028 Barcelona  
Tel. +34 934024505  
Fax +34 93 4035901

**Trinitat Cambras Riu**, Professora Titular de Fisiologia del Departament de Fisiologia (Farmàcia)  
de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memòria titulada “Dissociació dels ritmes circadianis i tractaments per al seu acoblament en rates sotmeses a cicles de llum-fosc de 22 i 23 hores” presentada per MONTSERRAT ANGLÈS PUJOLRÀS per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la meua direcció en el Departament de Fisiologia (Farmàcia), i considerant-la concloa, autoritzo la seva presentació per a què sigui jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que així consti, signo la present a Barcelona, el dia 11 de juliol de 2007.

Dra. Trinitat Cambras Riu



Els treballs realitzats en aquesta tesi han estat subvencionats pel Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI 2003 – 03489). Durant la seva realització, l'autora ha gaudit d'una "Beca de formació en la recerca i la docència" de la Universitat de Barcelona (2003-2007).





La Tesi Doctoral que esteu a punt de llegir no l'he escrit tota sola. És per això que vull donar les gràcies a totes aquelles persones que, de manera directa o indirecta, hi han participat.

El primer agraïment ha d'anar dirigit, indiscutiblement, a les dues persones que primer em van introduir el "cuquet" de la Crono, més tard em van acceptar en el seu grup i finalment, han treballat incansablement per fer realitat aquest somni. A la Dra. Trinitat Cambras, directora d'aquest treball, gràcies per tot el temps que has dedicat, tant a la part experimental com a l'escriptura d'aquesta tesi que és, en bona part, també teva. I al Dr. Antoni Díez, que amb el teu enginy i la teva disposició sempre has acabat trobant el recurs adient per tot allò que necessitàvem en cada ocasió. A tots dos us vull agraïr que m'hagueu permès participar en un grup d'excel·lent qualitat científica, però sobretot, d'extraordinària qualitat humana.

Als meus companys del grup de Crono: el Dr. Juan J. Chiesa, la Dra. Ágata R. Carpentieri i la Dra. Mari Sans: gràcies per la vostra participació activa en la part experimental d'aquesta tesi, per la vostra amistat i pels bons moments que tots plegats hem compartit dins i fora del laboratori.

Als companys i professors del Departament de Fisiologia, gràcies pel vostre acolliment i per les mostres de suport rebudes en tot moment.

A la Núria, la Montse, la Laura i la Susanna, que heu estat les meves companyes, les meves amigues i la meva família durant els anys viscuts a Barcelona. Gràcies per cada instant compartit.

Al Pere i a la Imma, per la vostra sincera amistat i per les estones que hem passat junts.

Al Pere, per estar al nostre costat.

Al Xavi i a la Noèlia, pel vostre optimisme i la vostra aportació en el disseny de la portada; a l'Oriol, per deixar-me fer pràctiques de mare, i al Pol, que tot just acabes d'arribar, per la pau que inspires.

A vosaltres, pare i mare, gràcies per haver renunciat a tot en favor de la meva formació. Gràcies per ensenyar-me la paraula “endavant” i per creure en mi quan jo no hi creia. Gràcies per tenir cura de la Txell sempre que ho he necessitat, però sobretot per fer-ho amb tant d’amor. Sense la vostra disposició hauria estat molt difícil acabar aquesta tesi.

A tu Xavi, que em vas empènyer a aquesta aventura sense ni deixar-m’ho pensar, gràcies per destacar sempre el millor de mi. Gràcies pel teu inesgotable ajut, per il·lusionar-te amb la meva feina i per ser allà on jo no arribo. Has estat el primer en invertir hores de son (ara que les tenim tan escasses) per a què aquesta tesi arribés a bon port. Tu que has volgut formar equip amb mi, gràcies per estimar-me tantíssim.

Txell, no ha estat gens fàcil deixar-te cada matí per venir a Barcelona, però la recompensa que he rebut cada vespre al tornar a casa i veure que m’estaves esperant amb aquella rialla de nena entremaliada, ha estat el motor per continuar endavant. Espero que quan siguis gran i llegeixis aquestes línies no em tinguis en compte tot el temps que t’he deixat de dedicar. Gràcies per ensenyar-me què són, en la pràctica, els ritmes ultradianis, la desincronització i l’insomni.

Als que no la podreu llegir perquè ja no hi sou, però que m’heu acompanyat durant alguna etapa d’aquest camí: al padrí Martí, que ni tan sols va poder veure el final de la llicenciatura, a la padrina Maria, que va veure com començava el doctorat i a la Rosa, que va marxar precipitadament sense tenir temps de conèixer la Txell, però que, sens dubte, la veu créixer des del cel.

A tots els que no he anomenat però que en algun moment us heu interessat per la meva feina o m’heu donat un cop de mà sense ni tan sols saber-ho.

A tots vosaltres, de tot cor, MOLTES GRÀCIES.

**A VOSALTRES PARE I MARE,**

*que sempre hi sou.*

**A TU XAVI, I A LA NOSTRA FILLA TXELL,**

*que ompliu cada segon, cada minut, cada hora de  
la meva vida.*



## CADA COSA TÉ EL SEU MOMENT

Tot té el seu moment,  
sota el cel hi ha un temps  
per a cada cosa.  
Hi ha un temps d'infantar  
i un temps de morir,  
un temps de plantar  
i un temps de collir.  
Un temps de matar  
i un temps de guarir,  
un temps d'enrunar  
i un temps de construir.  
Un temps de plorar  
i un temps de riure,  
un temps de plànyer-se  
i un temps de dansar.  
Un temps de tirar pedres  
i un temps d'aplegar-ne,  
un temps d'abraçar  
i un temps d'estar-se'n.  
Un temps de cercar  
i un temps de perdre,  
un temps de guardar  
i un temps de llençar.  
Un temps d'esquinçar  
i un temps de cosir,  
un temps de callar  
i un temps de parlar.  
Hi ha un temps d'estimar  
i un temps d'odiar,  
hi ha un temps de guerra  
i un temps de pau.

El qui treballa, què en treu del seu esforç? M'he fixat en les feines que Déu ha imposat als homes: I ell ha fet les coses boniques i apropiades al seu temps, i també ha donat a l'home el sentit del passat i del futur, però sense que l'home pugui arribar a comprendre, des del començament fins al final, l'obra que Déu ha fet.

... ..

Allò que ara és, ja ha estat abans, i allò que encara no és, també ja era. Déu és qui fa que tot continuï.

**Cohèret 3, 1-15**









Abreviatures.....	21
I. INTRODUCCIÓ.....	27
1. Conceptes bàsics en Cronobiologia.....	29
1.1. Cronobiologia i ritmes biològics.....	29
1.2. Ritme endogen.....	29
1.2.1. Període d'un ritme.....	30
1.2.2. Postefectes ( <i>aftereffects</i> ).....	30
1.2.3. Temps circadiari ( <i>circadian time</i> ).....	30
1.3. Encarrilament.....	31
1.3.1. Marges d'encarrilament.....	31
1.3.2. <i>Zeitgebers</i> .....	33
1.3.3. Corba de resposta de fase.....	33
1.4. Emmascarament ( <i>masking</i> ).....	34
2. Sistema circadiari.....	34
2.1. Organització del sistema circadiari.....	35
2.1.1. Nucli supraquiasmàtic.....	35
2.1.1.1. El nucli supraquiasmàtic com a sistema multioscil·lador.....	36
2.1.1.2. Zones del nucli supraquiasmàtic i neurotransmissors.....	36
2.1.1.3. Aferències i eferències del nucli supraquiasmàtic.....	38
2.1.2. Glàndula pineal.....	40
2.1.2.1. Melatonina.....	40
2.1.3. Gens rellotge.....	42
2.1.4. Oscil·ladors perifèrics.....	43
2.1.4.1. Oscil·ladors sincronitzats per alimentació restringida.....	43
3. Ritmes circadiaris estudiats en aquesta tesi.....	45
3.1. Activitat motora.....	45
3.2. Temperatura.....	45
3.3. Conducta de beguda.....	46
4. Manipulació del sistema circadiari.....	47
5. Alteracions dels ritmes biològics.....	49
5.1. Desincronització de ritmes.....	49
5.2. Dissociació del nucli supraquiasmàtic.....	52
II. OBJECTIUS.....	55
III. MATERIAL I MÈTODES.....	59
1. Animals.....	61
2. Condicions de manteniment.....	61

3. Il·luminació de les cabines .....	61
4. Mesura de les variables fisiològiques.....	61
4.1. Activitat motora.....	61
4.2. Temperatura .....	62
4.3. Conducta de beguda .....	62
4.4. Melatonina .....	62
5. Tractaments .....	62
5.1. Administració de melatonina.....	62
5.2. Administració de diazepam.....	63
5.3. Administració de xocs electroconvulsius .....	63
6. Intervencions quirúrgiques .....	63
6.1. Implantació de sensors de temperatura .....	63
6.2. Canulació de la vena jugular .....	63
6.3. Pinealectomia.....	64
6.4. Gangliectomia .....	64
7. Tractament i anàlisi de les dades .....	65
7.1. Mètodes específics de Cronobiologia.....	65
7.1.1. Doble-gràfica ( <i>double-plot</i> ) .....	65
7.1.2. Periodegrama de Sokolove-Bushell .....	65
7.1.3. Ona mitjana .....	66
7.1.4. Test de Rayleigh.....	66
7.2. <i>Software</i> d'anàlisi estadística i de ritmes .....	67
IV. EXPERIMENTS .....	69
Apartat I: La dissociació en diverses variables fisiològiques .....	73
Experiment 1: La dissociació en l'activitat motora, la temperatura i la conducta de beguda, sota cicles de 22 i 23 hores.....	75
<b>ARTICLE: Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages             in the rat .....</b>	95
Experiment 2: Secreció de melatonina en T22.....	103
Apartat II: Influències ambientals durant l'alletament en la inducció de la dissociació .....	109
Experiment 3: Efecte de l'exposició a cicles T durant l'alletament.....	111
<b>ARTICLE: Exposure to T-cycles of 22 and 23h during lactation modifies the later             dissociation of motor activity and temperature rhythms in rats.....</b>	113
Apartat III: Manipulacions exògenes dels ritmes circadianis del patró dissociat .....	135
Experiment 4: Efecte de l'alimentació restringida .....	137

---

<b>ARTICLE: Motor activity rhythms of forced desynchronized rats subjected to restricted feeding</b> .....	139
Experiment 5: Efecte de la melatonina i el diazepam .....	151
<b>ARTICLE: Effect of melatonin and diazepam on the dissociated circadian rhythm in rats</b> .....	153
Experiment 6: Efecte del xoc electroconvulsiu.....	163
<b>ARTICLE: Effects of electroconvulsive shock on the rat's motor activity and temperature circadian rhythms</b> .....	165
V. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	189
CONCLUSIONS .....	201
BIBLIOGRAFIA.....	207







---

<b>A</b>	àrea de l'oscil·lació de les dades al voltant de la mitjana
<b>aL</b>	<i>ad libitum</i>
<b>AM</b>	activitat motora
<b>B</b>	conducta de beguda
<b>C</b>	control
<b>CBT</b>	<i>core body temperature</i>
<b>CRF</b>	corba de resposta de fase
<b>CRH</b>	hormona alliberadora de corticotropina ( <i>corticotropine releasing hormone</i> )
<b>Cry</b>	gens criptocrom
<b>CT</b>	temps circadiari ( <i>circadian time</i> )
<b>DD</b>	fosc constant ( <i>dark-dark</i> )
<b>DM</b>	zona dorsomedial del nucli supraquiasmàtic
<b>DZP</b>	diazepam
<b>E</b>	experimental
<b>ECoG</b>	<i>electrocorticographic</i>
<b>ECS</b>	<i>electroconvulsive shock</i>
<b>ECT</b>	<i>electroconvulsive therapy</i>
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>FAA</b>	activitat anticipadora a l'aliment ( <i>food anticipatory activity</i> )
<b>FDC</b>	component dependent de l'aliment ( <i>food-dependent component</i> )
<b>FEO</b>	oscil·lador encarrilat per l'aliment ( <i>food-entrainable oscillator</i> )
<b>FEP</b>	marcapassos encarrilat per l'aliment ( <i>food-entrainable pacemaker</i> )
<b>GABA</b>	àcid gamma-aminobutíric ( <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
<b>GCS</b>	gangli cervical superior
<b>GnRH</b>	hormona alliberadora de gonadotropina ( <i>gonadotropin releasing hormone</i> )
<b>GRP</b>	pèptid alliberador de gastrina ( <i>gastrin releasing peptide</i> )

<b>GX</b>	gangliectomia ( <i>ganglionectomy</i> )
<b>HIOMT</b>	hidroxiindol- <i>O</i> -metil transferasa
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida d'alta pressió ( <i>high-pressure liquid chromatography</i> )
<b>ip</b>	intraperitoneal
<b>J</b>	components junts
<b>LD</b>	cicle llum-foscor ( <i>light-dark</i> )
<b>LDC</b>	component dependent de la llum ( <i>light-dependent component</i> )
<b>LEP</b>	marcapassos encarrilat per la llum ( <i>light-entrainable pacemaker</i> )
<b>LL</b>	llum constant ( <i>light-light</i> )
<b>MA</b>	motor activity
<b>MEL</b>	melatonina
<b>NA</b>	noradrenalina
<b>NAAG</b>	<i>N</i> -acetil aspartil glutamat
<b>NAT</b>	serotonina- <i>N</i> -acetil transferasa
<b>NLDC</b>	component no dependent de la llum ( <i>non-light-dependent component</i> )
<b>NPV</b>	nucli paraventricular de l'hipotàlem
<b>NPY</b>	neuropèptid Y
<b>NSQ</b>	nucli supraquiasmàtic
<b>NT</b>	neurotransmissor
<b>PACAP</b>	pèptid activador de l'adenilciclasa hipofisària
<b>PCH1</b>	contingut de potència del primer harmònic ( <i>power content for the first spectrum harmonic</i> )
<i>Per</i>	gens <i>period</i>
<b>p. ex.</b>	per exemple
<b>PRC</b>	<i>phase response curve</i>
<b>PS</b>	<i>paradoxical sleep</i>
<b>PV</b>	<i>percentage of variance</i>



---

<b>PVN</b>	<i>paraventricular nucleus of the hypothalamus</i>
<b>PX</b>	pinealectomia ( <i>pinealectomy</i> )
<b>r</b>	coeficient de correlació entre la forma d'ona i la sèrie original de dades
<b>RF</b>	alimentació restringida ( <i>restricted feeding</i> )
<b>RIA</b>	<i>radioimmunoassay</i>
<b>S</b>	components separats
<b>SAD</b>	depressió estacional ( <i>seasonal affective disorder</i> )
<b>SCG</b>	<i>superior cervical ganglion</i>
<b>SCN</b>	<i>suprachiasmatic nucleus</i>
<b>SNC</b>	sistema nerviós central
<b>SWS</b>	son d'ones lentes ( <i>slow-wave sleep</i> )
<b>T</b>	període
<b>tauRC (<math>\tau</math>RC)</b>	corba de resposta de període ( <i>period-response curve</i> )
<b>TEC</b>	teràpia electroconvulsiva
<b>TEMP</b>	temperatura
<b>TGH</b>	tracte geniculohipotalàmic
<b>TRH</b>	tracte retinohipotalàmic
<b>TSH</b>	hormona estimulant de la tiroide ( <i>thyroid-stimulating hormone</i> ) o tiotropina
<b>VEH</b>	vehicle ( <i>vehicle</i> )
<b>VIP</b>	peptid intestinal vasoactiu ( <i>vasoactive intestinal peptide</i> )
<b>VL</b>	zona ventrolateral del nucli supraquiasmàtic
<b>VP</b>	vasopressina
<b>XEC</b>	xoc electroconvulsiu
<b><math>\tau</math></b>	tau (període del ritme en curs lliure)
<b>%A</b>	valor d'A, expressat com a percentatge de l'àrea sota la corba total
<b>%V</b>	percentatge de variança explicat pel ritme



## I. INTRODUCCIÓ



Vivim en un món que canvia cíclicament gràcies als moviments que la Terra fa sobre sí mateixa i al voltant del Sol. Els canvis de llum que pateix el nostre planeta quan gira sobre el seu eix donen lloc al dia i a la nit, mentre que el moviment de translació origina canvis estacionals. Això fa que molts organismes manifestin variacions diàries en la seva fisiologia i el seu comportament (Hastings, 1970; Pittendrigh, 1993) i puguin predir i anticipar respostes a esdeveniments periòdics (Moore-Ede, 1986), desenvolupant, així, una estratègia de supervivència activa, enlloc de reactiva (Davidson *et al.*, 2004).

Per tal que els éssers vius puguin adaptar-se als fenòmens cíclics que contínuament es generen en la natura es fa necessària l'existència d'un sistema que integri aquesta informació i que alhora actuï com un rellotge, marcant a cada moment del dia o de la nit allò que l'organisme cal que faci per a una millor adaptació al cicle de llum-fosc (*light-dark* - LD).

Aquest sistema que permet a l'organisme mesurar el temps és el SISTEMA CIRCADIARI, el qual desenvolupa les funcions de generar ritmicitat i de sincronitzar les diverses variables biològiques dins el mateix organisme, així com d'harmonitzar aquest amb el món extern cíclic. Si alguna d'aquestes funcions no es duu a terme correctament, s'altera l'estructura fisiològica temporal de l'organisme fent que aquest pateixi una sèrie de trastorns que es tradueixen en malestar físic i que poden arribar a convertir-se en patologia.

## 1. CONCEPTES BÀSICS EN CRONOBIOLOGIA

### 1.1. Cronobiologia i ritmes biològics

L'evolució ha generat, en els organismes vius, variacions cícliques en quasi totes les seves variables biològiques (activitat motora, consum d'aigua i aliment, pressió arterial, ritme cardíac, secreció de cortisol, etc.). Aquestes fluctuacions, que són necessàries per al bon funcionament de l'organisme, s'anomenen RITMES BIOLÒGICS, i la ciència que els estudia és la CRONOBIOLOGIA.

En funció de la seva freqüència, els ritmes es poden classificar en: circadiaris (del llatí, *circa*, "al voltant de", i *diem*, "dia") si tenen una freqüència similar a la diària (p. ex. el ritme de temperatura corporal, els cicles de son-vigília, etc.), ultradiaris, si la seva freqüència és superior a la diària (p. ex. la secreció pulsàtil d'hormones, el batec del cor, la respiració, etc.), o infradiaris, si es presenten amb una freqüència inferior a la diària (p. ex. el cicle menstrual, etc.).

Els ritmes circadiaris, generats gràcies a l'adaptació a l'alternança entre el dia i la nit, són presents en la majoria d'organismes vius, incloent els organismes unicel·lulars (Hastings, 1970), i el seu estudi és l'objectiu d'aquesta tesi.

### 1.2. Ritme endogen

Un ritme que persisteixi en condicions constants i que sigui generat pel propi

organisme és un RITME ENDOGEN (Davidson *et al.*, 2004) mentre que un ritme exogen serà aquell que no sigui generat pel propi organisme sinó per una influència externa que es repeteixi periòdicament.

Els ritmes circadianis presenten oscil·lacions generades endògenament que es repeteixen amb una freqüència propera a les 24 hores i estan sincronitzats, mantenint una relació de fases estable, amb senyals periòdiques mediambientals, principalment el cicle de llum-fosc.

### 1.2.1. Període d'un ritme

Quan un animal es troba en condicions ambientals constants, o el que és el mateix, en CURS LLIURE, els seus ritmes manifesten un PERÍODE ENDOGEN o TAU ( $\tau$ ) proper, però diferent, a 24 hores. A priori, resulta estrany que un organisme que viu en un entorn de 24h presenti un període endogen diferent d'aquest, però cal tenir en compte que només 2 dies de l'any tenen un PERÍODE (T) de 24h (en la nostra latitud, durant la primavera i l'estiu els dies tenen un període superior a 24h, mentre que durant la tardor i l'hivern, els dies duren menys de 24h). Per tant, donada aquesta circumstància, l'organisme requereix un sistema que li permeti adaptar-se a aquests cicles LD que varien al llarg de l'any. Per tal de fer l'adaptació, a l'organisme li resulta més eficient seguir un període diferent de 24h, però disposar d'un bon mecanisme de sincronització.

El marcapassos que genera i transmet oscil·lacions amb aquest període i que s'adapta contínuament a la durada de cada dia no és extern, sinó que és una estructura interna i pròpia de cada organisme (Takahashi i Zatz, 1982).

### 1.2.2. Postefectes (*aftereffects*)

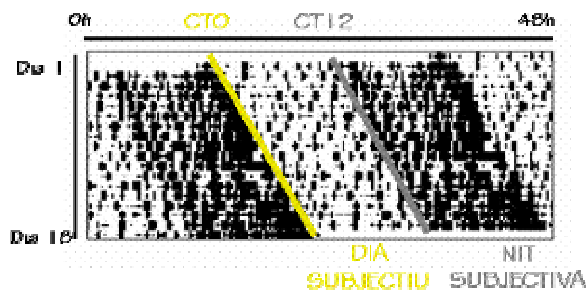
El terme POSTEFECTES, en anglès *AFTEREFFECTS*, defineix els canvis que experimenta el període d'un ritme després d'haver estat en unes condicions diferents de les actuals; és a dir, el període depèn de la història prèvia que hagi viscut aquell animal.

Aquests canvis solen ser a llarg termini i en moltes ocasions són necessaris més de 100 cicles de curs lliure per retornar al valor estable de tau (Pittendrigh i Daan, 1976).

### 1.2.3. Temps circadiani (*circadian time*)

Quan un organisme es troba en condicions de curs lliure la durada dels seus dies és diferent de 24 hores. Això fa que, enlloc de dies naturals s'anomenin dies subjectius. D'aquesta manera, un organisme en curs lliure presentarà cicles que es poden dividir en 24 hores subjectives o circadianes, que duraran més o menys d'una hora, en funció del  $\tau$  de l'individu. Així, en condicions ambientals constants, la manera d'expressar el temps serà amb el terme TEMPS CIRCADIARI o, en anglès, *CIRCADIAN TIME (CT)*. Per conveni, s'ha designat CTO a l'inici del dia subjectiu, que és el moment en el qual l'animal fa allò

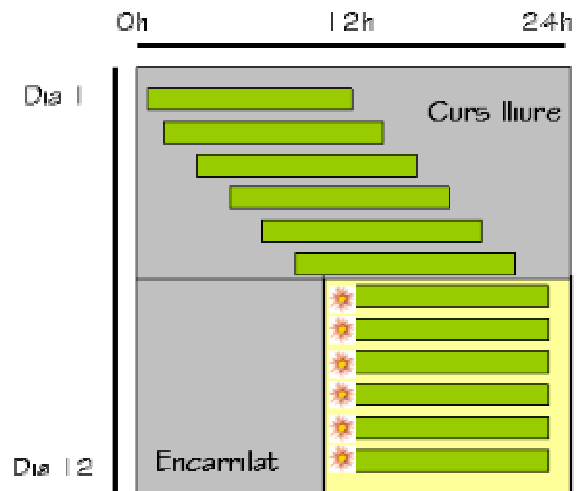
que faria si fos de dia, i CT12, a l'inici de la nit subjectiva (moment en el qual l'individu actua com si fos de nit) (Figura I-1). En el cas de la rata, que és l'animal tractat en aquesta tesi, el CT12, o l'inici de la nit subjectiva, correspon amb l'inici de la fase d'activitat degut al caràcter nocturn d'aquest rosegador.



**Figura I-1.** Actograma d'una rata en curs lliure. S'hi representa el CT0 i el CT12, i també el dia i la nit subjectius.

### 1.3. Encarrilament

Quan un fenomen mediambiental cíclic imposa i controla el període i la fase d'un ritme que estava en curs lliure, diem que el RITME està ENCARRILAT per aquest fenomen; és a dir, es produeix sincronització entre el ritme d'una variable fisiològica i un fenomen mediambiental, mantenint una relació de fases estable (Figura I-2).



**Figura I-2.** Esquema del patró d'un ritme en curs lliure (1a. part) i d'un ritme encarrilat (2a. part).

L'encarrilament estable a un cicle de LD s'aconsegueix gràcies a petits ajusts diaris de període i/o de fase. Els individus amb un tau inferior al període del cicle extern, necessitaran cada dia un retard per tal d'aconseguir encarrilar, mentre que als individus el tau dels quals sigui superior al període del cicle extern, els caldrà cada dia avançar la seva fase per a assolir l'encarrilament (Takahashi i Zatz, 1982). Els avanços o retards han de compensar la diferència entre  $T$  i  $\tau$ .

#### 1.3.1. Marges d'encarrilament

El rellotge biològic no pot encarrilar a cicles de qualsevol període, sinó només als cicles el període dels quals estigui dins d'uns límits, que són els MARGES D'ENCARRILAMENT (Aschoff, 1978; Cambras, 2006). Més enllà d'aquests límits, que varien en funció de l'espècie (Aschoff i Pohl, 1978), de l'edat (Ehret *et al.*, 1978) i de la força del

*zeitgeber* (Aschoff i Pohl, 1978), el ritme va en curs lliure amb un període proper al tau de l'animal (Aschoff, 1978).

Prop dels marges d'encarrilament no es produeix sincronització total. Això es podria explicar a través de la hipòtesi que planteja que el sistema circadiari de la rata està format per un conjunt d'oscil·ladors que posseeixen diferent capacitat per sincronitzar al cicle LD i que oscil·len amb diferent freqüència (Madrid *et al.*, 1998); segons aquesta hipòtesi, la majoria d'oscil·ladors fluctuarien amb el mateix període en el qual l'organisme encarrila totalment, però n'hi hauria una part que oscil·larien amb una freqüència diferent, que els situaria en els marges d'encarrilament, on serien incapaços d'encarrilar.

S'han fet múltiples estudis encaminats a trobar els marges d'encarrilament de diferents espècies, però els resultats obtinguts són diversos perquè les condicions experimentals de cada un d'ells ha estat diferent. Un exemple és el treball fet per Madrid *et al.*, l'any 1998, en el qual augmentant i disminuint el fotoperíode al qual estaven exposats els animals es pretenia trobar els marges d'encarrilament de la rata. Els límits trobats en aquest experiment van ser de 22h 9min per al límit inferior i de 26h 44min per al límit superior. També cal tenir en compte que a la natura la intensitat lumínica varia gradualment al llarg del dia, mentre que en el laboratori, la majoria d'estudis es fan utilitzant canvis abruptes d'intensitat, alternant períodes de

llum amb períodes de foscor. Un estudi preliminar fet per Usui *et al.*, l'any 1999, utilitzant intensitats graduals de llum va aproximar el límit inferior d'encarrilament de la rata a T23. Més tard, els mateixos autors (Usui *et al.*, 2000), comparant els marges d'encarrilament de rates sotmeses a cicles LD rectangulars amb els trobats utilitzant alternances de llum-foscor sinusoidals, van concloure que els límits són més amplis quan els animals es troben sota condicions graduals de llum. Així doncs, sota aquestes condicions, els marges d'encarrilament per la rata anaven des de T22 fins a T28,5, mentre que quan els animals estaven sotmesos a cicles rectangulars de llum-foscor, els límits d'encarrilament per al mateix animal anaven de T23,5 a T28,5. L'any 2005, un estudi dut a terme en el nostre laboratori per Chiesa *et al.*, va concloure que el límit inferior d'encarrilament dels hámsters podia arribar a 19h 36min. Aquest experiment es va realitzar col·locant els animals en gàbies individuals les quals disposaven d'una roda i disminuint gradualment el fotoperíode (de T22 a T19) al qual estaven sotmesos els hámsters.

Així doncs, els marges d'encarrilament són lleugerament diferents per cada espècie estudiada i també depenen de les condicions experimentals en les quals es trobin els animals.



### 1.3.2. Zeitgebers

Els elements externs que l'organisme utilitza com a referències temporals per poder encarrilar els seus ritmes s'anomenen *ZEITGEBERS* (de l'alemany, "el qui dona o marca el temps"). Molt poques variables mediambientals poden realment encarrilar els ritmes circadianis, i la principal són les transicions llum-fosc (Takahashi i Zatz, 1982), però n'hi ha d'altres, agrupades sota el terme de "*zeitgebers* no-fòtics", que també es creu que puguin participar en el fenomen de l'encarrilament.

Els principals *zeitgebers* no-fòtics són: els cicles de temperatura, l'accés a alimentació restringida a unes hores al dia, l'exercici físic o els senyals socials.

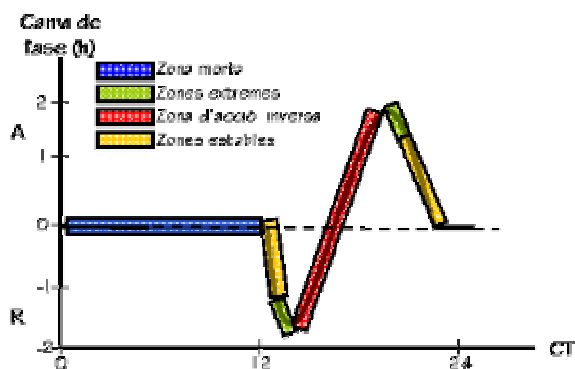
Degut al caràcter transcendent que té la nutrició en la supervivència d'un animal, l'alimentació restringida ocupa un lloc destacat dins dels *zeitgebers* no-fòtics. S'ha observat que molts animals tenen la capacitat d'anticipar els "àpats", quan es donen cada 24h, ja que 2-3 hores abans augmenta la seva activitat motora. És el que s'anomena ACTIVITAT ANTICIPADORA A L'ALIMENT (en anglès, *FOOD ANTICIPATORY ACTIVITY – FAA*) (Mistlberger, 1994). Així doncs, un animal nocturn sotmés a un cicle LD i que només se li permeti l'accés a l'aliment durant unes hores de la fase de llum tindrà un ritme d'activitat motora dividit en dos components: un component serà el normal, d'activitat nocturna guiat pel cicle LD, i l'altre vindrà

dirigit per l'accés restringit a l'aliment, on s'hi observarà l'FAA.

### 1.3.3. Corba de resposta de fase

Perquè un *zeitgeber* (p. ex. el cicle LD) pugui encarrilar el sistema circadiani d'un organisme cal que vagi corregint la fase del ritme cicle a cicle. L'aplicació puntual d'un *zeitgeber*, però, no sempre produeix el mateix efecte sobre la fase d'un ritme, sinó que depèn del moment del dia subjectiu en el qual s'hagi aplicat (Pittendrigh, 1988). Un pols de llum pot produir un avançament de fase, un retard, o bé no produir cap canvi. La magnitud i la direcció del canvi de fase dependrà de la fase del ritme i de l'estímul aplicat.

La CORBA DE RESPOSTA DE FASE (CRF) és la forma gràfica de representar els canvis de fase produïts per un *zeitgeber* sobre un ritme determinat (Takahashi i Zatz, 1982) i ens serveix per estudiar el fenomen de l'encarrilament (Figura I-3). En abscisses es representa un dia subjectiu complet, de CT0 a CT24, i en ordenades es representen els canvis de fase corresponents. Per conveni, els avançaments es representen en positiu i els retards en negatiu.



**Figura I-3.** Esquema d'una CRF típica i les seves zones (A= avançaments; R= retards).

Les CRF són diferents per cada *zeitgeber*, variable i espècie. En una CRF típica per a l'estímul llum i per a la rata, es produeixen els següents efectes: la llum durant el dia subjectiu (entre CT0 i CT12) provoca mínims o despreciables canvis de fase; aquesta zona rep el nom de "zona morta". En canvi, un pols de llum durant la nit afecta la fase del ritme, de manera que un pols de llum a l'inici de la nit subjectiva induïx un retard de fase i un pols de llum al final de la nit subjectiva produeix un avançament de fase (Summer *et al.*, 1984). Els punts on tenen lloc els valors màxims de la CRF reben el nom de "zones extremes"; les "zones d'acció inversa" són les parts de la CRF on el canvi de fase és contrari al que seria necessari per a produir encarrilament, i les "zones estables" són les que tenen pendent negativa i produeixen els canvis necessaris perquè s'esdevingui aquest fenomen. De fet, l'encarrilament només es produirà quan el pols de llum coincideixi amb aquestes zones de la CRF (Cambras, 2006; Moore-Ede *et al.*, 1982).

## 1.4. Emmascarament (*masking*)

L'EMMASCARAMENT (*MASKING*, en anglès) és l'efecte produït per un element extern quan aquest actua de forma cíclica sobre el sistema efector, alterant el ritme observat sense afectar el rellotge intern (Jud *et al.*, 2005). És equivalent a dir que aquest element extern afecta les manetes del rellotge però no el seu mecanisme intern. La diferència, des del punt de vista rítmic, entre emmascarament i encarrilament radica en què només l'encarrilament implica control de fase del ritme extern sobre el ritme de l'organisme. Per esbrinar si es tracta d'un fenomen o de l'altre, cal retirar l'agent extern. Si aquest era un veritable *zeitgeber* la fase del ritme pràcticament no variarà, mentre que si només era un agent emmascarador, al treure'l, el ritme en curs lliure començarà en una fase diferent de la marcada pel cicle exogen. Una altra característica que els distingeix és la capacitat d'anticipar: l'anticipació sempre implica l'existència d'encarrilament (Cambras, 2006).

## 2. SISTEMA CIRCADIARI

Cada ésser viu té un rellotge intern, i sense ell, l'oscil·lació de la majoria de variables fisiològiques i conductuals desapareixeria. Però com està format i on es troba situat aquest rellotge, en els mamífers?

## 2.1. Organització del sistema circadiari

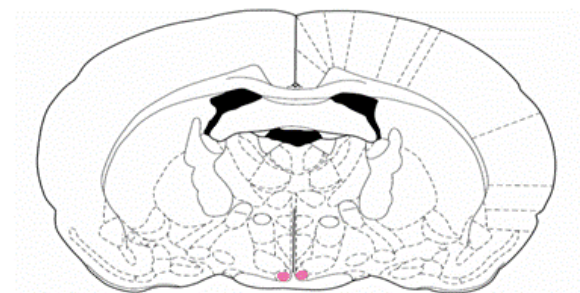
El sistema circadiari està format per un oscil·lador central i un conjunt d'oscil·ladors perifèrics, però també per una sèrie de vies aferents i eferents, que els aporten i els permeten enviar informació (Buijs i Kalsbeek, 2001; Hofman, 2004; Kalsbeek i Buijs, 2002; Takahashi i Zatz, 1982). La interacció entre els oscil·ladors i la d'aquests amb el medi ambient es duu a terme d'una forma jeràrquica: el nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem és l'oscil·lador principal i és l'únic que rep informació directament del *zeitgeber* principal, que és el cicle LD (Weinert, 2005). Per la seva banda, el nucli supraquiasmàtic exerceix control sobre els oscil·ladors perifèrics a través de connexions nervioses (Bartness *et al.*, 2001) o de missatges humorals (Silver *et al.*, 1996), generant, així, els ritmes. Però no és només un òrgan de control, sinó que també participa en els sistemes de retroalimentació; p. ex. la melatonina i l'activitat locomotora exerceixen un efecte de *feedback* sobre el nucli supraquiasmàtic (Cassone *et al.*, 1993; Edgar *et al.*, 1991).

Els estímuls externs poden afectar el sistema a nivell d'oscil·ladors perifèrics o d'òrgans efectors, actuant com agents emascaradors, o bé directament a nivell de nucli supraquiasmàtic, actuant com a *zeitgebers* (Refinetti, 2006).

### 2.1.1. Nucli supraquiasmàtic

El NUCLI SUPRAQUIASMÀTIC (NSQ) és l'estructura del sistema nerviós que genera i coordina els ritmes circadianis de diverses funcions fisiològiques, endocrines i comportamentals (Hofman, 2004; Shirakawa *et al.*, 2001).

En els mamífers, el NSQ està format per dos nuclis simètrics i ovalats, un a cada banda del tercer ventricle, situats a la part ventral de l'hipotàlem, per sobre del quiasma òptic (Figura I-4). Cada nucli està format per unes 10000 neurones (Piggins i Loudon, 2005; Van den Pol, 1980; Van den Pol, 1991).



**Figura I-4.** Localització dels NSQ en una secció de cervell de rata (Paxinos i Watson, 1997).

Tot i tractar-se de dos nuclis funcionen com una sola estructura, generant oscil·lacions espontàniament, mantenint la ritmicitat tant *in vivo* com *in vitro* (Weaver, 1998), i transmetent-la a la resta de l'organisme.

La primera prova que confirma la propietat del NSQ com a generador de ritmes és que l'ablació d'aquest aboleix el

ritme circadiari d'activitat locomotora (Schwartz i Zimmerman, 1991) i també provoca la pèrdua dels components circadianis i ultradianis quan els animals estan en curs lliure o sota cicles de LD 12:12 (Wollnik i Turek, 1989). Una altra prova que ho corrobora és un experiment fet per Ralph *et al.* l'any 1990, on es demostrava que el transplantament de teixit fetal del NSQ d'un animal a un altre que tenia el NSQ lesionat i que per tant era arrítmic, provocava en l'animal receptor el desenvolupament de ritmicitat circadiana amb les propietats del rellotge del donant. Per altra banda, quan es manté una part de teixit de NSQ en una preparació histològica, es pot observar que les neurones continuen originant ritmes circadianis d'activitat elèctrica (Green i Gillette, 1982).

### **2.1.1.1. El nucli supraquiasmàtic com a sistema multioscil·lador**

El NSQ conté una població de neurones (Welsh *et al.*, 1995) que oscil·len a diferents freqüències, però totes dins el marge circadiari (Díez-Noguera, 1994).

Segons això, el sistema circadiari és un sistema multioscil·latori en el qual els seus components, neurones o grups de neurones, interactuen entre elles i poden oscil·lar amb diferents graus d'acoblament, depenent de les condicions de llum externes.

L'*splitting*<sup>1</sup> (Boulos i Rusak, 1982) en els hàsters i els ritmes ultradianis (Eastman i Rechtschaffen, 1983; Honma i Honma, 1985) podrien ser algunes de les manifestacions que podrien ser causades per oscil·ladors circadianis desacobllats i que indicarien que el sistema circadiari està format per més d'un oscil·lador.

### **2.1.1.2. Zones del nucli supraquiasmàtic i neurotransmissors**

Cada nucli es pot dividir morfològicament en dues parts: una part central, que correspon a la part VENTROLATERAL (VL) i una part cortical, que és DORSOMEDIAL (DM) (Moore *et al.*, 2002).

La part VL rep informació directament de la retina (informació fòtica), i les neurones d'aquesta zona bàsicament contenen pèptid intestinal vasoactiu (VIP) (Abrahamson i Moore, 2001; Card *et al.*, 1981; Card *et al.*, 1988) i pèptid alliberador de gastrina (GRP), entre d'altres. S'ha especulat la participació del VIP en l'entrada de llum (Inouye i Shibata, 1994).

La part DM, en canvi, rep escassa informació de la retina. Aquesta regió rep aferències de la part VL i d'altres àrees del cervell. El neuropèptid que contenen les neurones d'aquesta zona és principalment la

---

<sup>1</sup> L'*splitting* és un fenomen que es presenta en hàsters i en altres espècies d'animals quan són mantinguts durant un cert temps en llum constant. Apareix per una dissociació del ritme circadiari, de manera que al llarg d'un dia apareixen dues fases d'activitat i dues de repòs, com si el ritme d'activitat s'hagués dissociat en dos components circadianis d'igual o diferent període (Turek *et al.*, 1982).

vasopressina (VP) (Abrahamson i Moore, 2001), però també hi ha neurotensina (Van den Pol i Tsujimoto, 1985; Vandesande *et al.*, 1975) i angiotensina II (Abrahamson i Moore, 2001). La VP experimenta un clar ritme circadiari (van Esseveldt *et al.*, 2000) i es creu que participa en les vies eferents del NSQ (Kalsbeek *et al.*, 1996b; Palm *et al.*, 1999).

L'organització del sistema circadiari varia entre espècies. De tots els aspectes comentats en aquest apartat, el més notable i que es presenta de manera similar en tots els rosegadors, és que en la zona DM hi predomina principalment la VP i en la zona VL, el VIP (Moore *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2006).

En la zona central, localitzada entre les regions VL i DM, les neurones contenen somatostatina i substància P (Card *et al.*, 1988; Mikkelsen i Larsen, 1993; Reuss *et al.*, 1994).

Moltes neurones d'ambdues parts del NSQ contenen ÀCID GAMMA-AMINO BUTÍRIC (GABA), calbindina (Abrahamson i Moore, 2001) i factor alliberador de tirotròpina.

El GABA desenvolupa diverses funcions, entre les quals destaca la seva contribució en la comunicació entre neurones d'ambdues parts. El reajustament de la part DM a unes noves condicions de llum depèn, en part, de la informació provinent de la zona VL, conduïda per aquest NT (Piggins i Loudon, 2005). El GABA també intervé en la regulació de la secreció de melatonina. Durant el dia, les neurones del NSQ

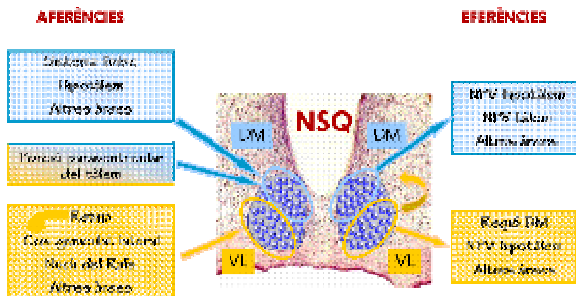
alliberen GABA, que actua inhibint les neurones del nucli paraventricular de l'hipotàlem (NPV) (Kalsbeek *et al.*, 1996a; Kalsbeek *et al.*, 1999; Kalsbeek *et al.*, 2000). A la nit, quan desapareix aquesta inhibició, les neurones de l'NPV s'activen i com a resultat s'indueix l'alliberament de melatonina, obtenint així el típic pic associat a la fase de foscor.

Així doncs, el GABA juntament amb la VP, que és un NT excitatori (Buijs i Kalsbeek, 2001), resulten essencials a l'hora de transmetre el senyal rítmic del NSQ. Clàssicament, s'ha considerat el GABA com el principal neurotransmissor (NT) del NSQ (Moore *et al.*, 2002; Moore i Speh, 1993; Okamura *et al.*, 1989; Saper *et al.*, 2005). Actualment, s'ha descrit que aquest NT, que és sintetitzat a partir del glutamat per un enzim específic (àcid glutàmic decarboxilasa), presenta un efecte excitatori a la part dorsal del NSQ, mentre que sobre la part ventral presenta un efecte majoritàriament inhibitori (Albus *et al.*, 2005).

Tot i que fins ara s'ha parlat de la divisió del NSQ en dues parts (VL i DM), estudis recents fets per Morin i Allen (2006), conclouen que l'organització d'aquest és molt més complexa, i que el NSQ dels rosegadors es podria subdividir no en dues parts, sinó en tres o fins i tot quatre divisions, en funció dels paràmetres morfològics i histoquímics emprats alhora de fer les divisions.

### 2.1.1.3. Aferències i eferències del nucli supraquiasmàtic

El NSQ rep i envia informació a través de les següents vies (Figura I-5):



**Figura I-5.** Vies aferents i eferents del sistema circadiari (adaptat de Leak i Moore, 2001).

#### VIAS AFERENTS:

1) TRACTE RETINOHIPOTALÀMIC (TRH): està format pels àxons de les cèl·lules ganglionars de la retina que contenen melanopsina i va, de la retina fins majoritàriament, a la regió VL del NSQ (Abizaid *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 1998; Reuss i Fuchs, 2000). Aquesta ruta, que és diferent de la via de la visió (Moore i Lenn, 1972), s'encarrega de la sincronització fòtica (Freedman *et al.*, 1999; Moore i Lenn, 1972; Morin i Allen, 2006), i també indueix l'expressió de gens que encarrilaran el NSQ al patró de LD (Albrecht *et al.*, 2001; Shigeyoshi *et al.*, 1997).

Els NT que actuen en aquesta via són: principalment el glutamat i el pèptid activador de l'adenilciclasa hipofisària (PACAP) (Colwell i Menaker, 1996; de Vries *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1994), però també, l'n-acetil aspartil glutamat (NAAG) i la substància P (Hannibal, 2002; Moore *et al.*,

2002; Shirakawa *et al.*, 2001; van Esseveldt *et al.*, 2000).

2) TRACTE GENICULOHIPOTALÀMIC (TGH): Prové del cos geniculat lateral del tàlem i va als NSQ. És una via indirecta des de la retina (Moore *et al.*, 2000; Morin i Blanchard, 2001) que, tot i no ser necessària per a l'encarrilament, pot modular els efectes de la llum sobre el NSQ (Harrington i Rusak, 1988).

Els principals NT són el neuropètid Y (NPY), el GABA i les encefalines (Hannibal, 2002; Moore *et al.*, 2002; Shirakawa *et al.*, 2001; van Esseveldt *et al.*, 2000).

3) VIAS PROVINENTS DEL NUCLI DEL RAPE: Estan implicades en la comunicació de senyals no fòtiques (Refinetti, 2006).

El NT principal d'aquesta via és la serotonina (Aghajanian *et al.*, 1969; Yannielli i Harrington, 2004), i està implicat en la modulació dels efectes de la llum sobre la ritmicitat circadiària (Meyer-Bernstein i Morin, 1996; Pickard i Rea, 1997). L'aplicació de serotonina o d'agonistes sobre el NSQ durant la nit subjectiva, bloqueja els canvis de fase induïts per la llum (Rea *et al.*, 1994), mentre que les mateixes substàncies administrades durant el dia subjectiu induïxen avançaments de fase del ritme circadiari (Prosser *et al.*, 1990; Edgar *et al.*, 1993).

4) NEURONES TUBEROMAMIL·LARS DE L'HIPOTÀLEM

POSTERIOR: Són vies que provenen del cos tuberomamil·lar de l'hipotàlem, i el principal NT n'és la histamina, la qual participa en diverses funcions bàsiques, com el cicle son-vigília, mecanismes homeostàtics, plasticitat sinàptica i memòria (Brown *et al.*, 2001; Haas i Panula, 2003). Per altra banda, diversos autors suggereixen que la histamina modula els ritmes circadianis (Abe *et al.*, 2004; Tuomisto *et al.*, 2001), participant en el seu encarrilament (Jacobs *et al.*, 2000).

El fet que l'administració d'histamina provoqui canvis de fase en l'activitat rítmica neural *in vitro* i en el ritme d'activitat locomotora *in vivo* similars als que produeix la llum, suggereix la possibilitat de què la histamina pugui estar involucrada en la modulació de l'entrada de llum al sistema circadiani (Cote i Harrington, 1993).

5) SISTEMA LÍMBIC: Projecta principalment cap a la zona DM del NSQ (Refinetti, 2006).

VIES EFERENTS:

Per altra banda, del NSQ en surten senyals que confereixen ritmicitat circadiana a l'organisme (Turek *et al.*, 1995). Els senyals eferents procedents del NSQ regulen rítmicament l'alliberament de certes hormones com el cortisol, l'hormona estimuladora de la tiroide (TSH), l'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH), l'hormona alliberadora de corticotropina (CRH) (Buijs i Kalsbeek, 2001), la

melatonina, etc.; regulen funcions biofísiques, com la temperatura corporal; i també controlen funcions comportamentals, com l'activitat/repòs o el son/vigília.

1) EFERÈNCIES AL MATEIX HIPOTÀLEM:

- Al propi NSQ: la part VL del NSQ envia informació cap A LA REGIÓ DM, mentre que la projecció inversa és minoritària (Leak *et al.*, 1999).

- Al NUCLI PARAVENTRICULAR DE L'HIPOTÀLEM<sup>2</sup>, la informació arriba provinent d'ambdues parts del NSQ (Leak *et al.*, 1999) i està destinada a controlar els ritmes de funcions hormonals (melatonina).

- A L'ÀREA PREÒPTICA. Té relació amb la regulació de la temperatura, el balanç de fluids, la conducta sexual i el control del son i la vigília (Mistlberger, 2005).

- A L'ÀREA RETROQUIASMÀTICA. Està relacionada amb la regulació de l'estat conductual i la integració neocortical, la regulació autonòmica i el control sensorimotor (Swanson i Cowan, 1975).

2) EFERÈNCIES EXTRAHIPOTALÀMIQUES:

- Al NUCLI PARAVENTRICULAR DEL TÀLEM, que intervé en la regulació de la locomoció. Aquesta informació prové principalment de la regió DM del NSQ.

- Al SISTEMA LÍMBIC, regulant la memòria i el to afectiu.

- Al NUCLI GENICULAT LATERAL.

---

<sup>2</sup> Veure apartat 2.1.2.

(Swanson i Cowan, 1975; Takahashi i Zatz, 1982).

- AL LOCUS COERULEUS, que després de rebre un senyal procedent del NSQ, activa les àrees del cervell involucrades específicament en la modulació del son i de la vigília (Refinetti, 2006).

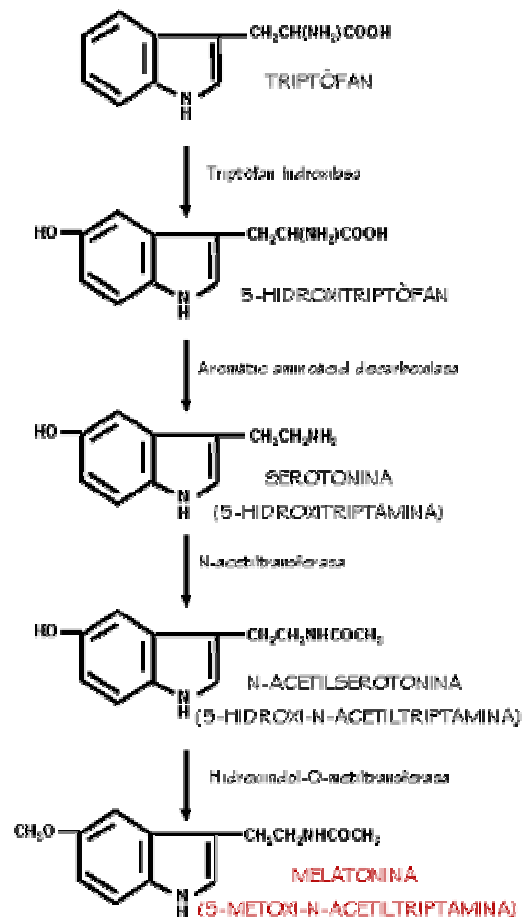
### 2.1.2. Glàndula pineal

La GLÀNDULA PINEAL és un òrgan neuroendocrí situat, en els mamífers, al centre anatòmic del cervell, entre el mesencèfal i el diencèfal (Moller i Baeres, 2002), i funciona com un oscil·lador central en moltes espècies de vertebrats no mamífers. En aus i rèptils, és directament fotosensible i actua com a marcapassos, generant ritmicitat endògena, alhora que s'encarrega de les funcions fotoreceptives i de la producció de melatonina. En els mamífers, en canvi, la regulació d'aquesta glàndula depèn del NSQ i aquesta no té sensibilitat directa a la llum ni capacitat de generar ritmes circadianis; únicament té la funció de sintetitzar l'hormona melatonina, acció que es produeix en un tipus de cèl·lules determinat: els pinealòcits (Fukada i Okano, 2002; Korf *et al.*, 1998; Moller i Baeres, 2002; Takahashi i Zatz, 1982).

#### 2.1.2.1. Melatonina

La MELATONINA (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), descoberta per Lerner *et al.* l'any 1958, és l'hormona sintetitzada i secretada per la glàndula pineal en animals

tant diürns com nocturns, durant la "nit subjectiva" i la seva funció principal és informar de la durada de la nit (Arendt i Skene, 2005; Reiter, 1993). És sintetitzada (Figura 1-6) a partir del triptòfan, que és transformat en serotonina; la serotonina és convertida en melatonina després de dos processos on s'hi veuen implicats dos enzims, el serotonina-*N*-acetil transferasa (NAT), que és l'enzim limitant (Sassone-Corsi, 1998), i l'hidroxiindol-*O*-metil transferasa (HIOMT) (Klein i Moore, 1979).

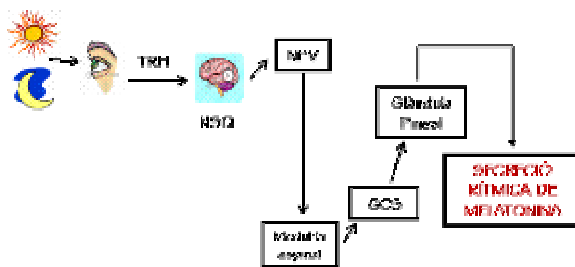


**Figura 1-6.** Síntesi de melatonina a partir de triptòfan.

En mamífers, la informació lumínica passa de la retina al NSQ a través del TRH;



del NSQ va al NPV, a la medulla espinal, als ganglis cervicals superiors (GCS), i finalment, a la glàndula pineal, on l'hormona melatonina és sintetitzada (Figura I-7) (Reiter, 2003). Tot seguit és alliberada al torrent sanguini a través del qual és conduïda fins als teixits diana, entre els que hi ha el NSQ que disposa de receptors per a aquesta hormona. Mitjançant aquest procés de *feedback* es regula la secreció de melatonina.



**Figura I-7.** Mecanisme de regulació de la secreció rítmica de melatonina a través de la llum. (NPV = nucli paraventricular de l'hipotàlem; GCS = ganglis cervicals superiors).

Estudis anteriors havien demostrat que, en les rates, l'alliberament de noradrenalina (NA) per part de les neurones dels GCS estimulava els receptors adrenèrgics situats en la glàndula pineal desencadenant la síntesi de melatonina (Reiter, 1991). Aquest fenomen es produïa durant la nit perquè en un cicle LD l'alliberament de NA és més alt durant la nit que durant el dia (Brownstein i Axelrod, 1974). Però, estudis fets en rates per Sassoni-Corsi, l'any 1998, van suggerir que la davallada en la síntesi de melatonina que es produïa a la matinada no era conseqüència directa de la inhibició de

l'alliberament de NA, produïda al final de la nit, sinó que podia ser induïda per un factor "intra-pineal". Posteriorment s'ha observat que, en la rata, el NSQ utilitza una combinació de senyals, inhibidors durant el dia i estimuladors durant la nit, dirigits a la glàndula pineal per tal de controlar el ritme diari de síntesi de melatonina (Kalsbeek *et al.*, 2000; Perreau-Lenz *et al.*, 2003; Perreau-Lenz *et al.*, 2004), essent el GABA el responsable del missatge inhibidor durant el dia, i el glutamat el de l'estimulador durant la nit. Però hi ha altres substàncies que estimulen la secreció de melatonina, com el VIP i alguns opioïds, mentre que el neuropèptid Y i la dopamina n'inhibeixen la producció (Claustrat *et al.*, 2005). La síntesi de melatonina també es veu afectada per l'edat de l'individu: en individus d'edat avançada, l'amplitud disminueix considerablement (Reiter, 1992; Sack *et al.*, 1986).

Per altra banda, s'ha comprovat que, si la connexió entre el NSQ i la glàndula pineal es talla, aquesta deixa de secretar melatonina i, si la glàndula és exposada a llum constant, es produeix el mateix efecte (Reiter, 2006; Takahashi i Zatz, 1982).

La síntesi i alliberament de melatonina per part de la glàndula pineal presenta un ritme circadiari robust que és regulat per la presència de llum i pel NSQ (Moore, 1996).

En l'espècie humana, la secreció es produeix durant la nit, ja que la llum inhibeix la producció de melatonina (Illnerová i Vanêcek, 1979) i, a major intensitat de llum,

major és l'efecte (Lewy *et al.*, 1980). Els nivells plasmàtics més alts es produeixen al voltant de les 03:00-04:00 a.m., mentre que els nivells diürns són molt baixos o, fins i tot, indetectables (Claustrat *et al.*, 1986; Follenius *et al.*, 1995). La llum artificial pot fer reduir notablement la producció de melatonina evitant que el NSQ envii la informació necessària a la glàndula pineal perquè aquesta secreti l'hormona (Reiter, 2003). Així, en l'espècie humana, una intensitat de llum de 2000-2500 lux durant 2h (02:00-04:00 a.m.) suprimeix completament la secreció de melatonina, i intensitats de llum domèstiques (50-300 lux) tenen, també, un considerable poder supressor (Bojkowski *et al.*, 1987).

La llum aplicada en forma de polsos de llum de molt curta durada durant la nit actua inhibint la síntesi de melatonina, mentre que l'alternança de períodes de llum i de foscor sincronitza el ritme de melatonina a 24 hores (Reiter, 2003). Conseqüentment, la variació en la durada del fotoperíode al llarg de l'any provoca el corresponent canvi en la durada de la producció de melatonina. Això és emprat per molts animals com a "marcador temporal" per a la regulació de la hibernació, migració i estro (Goldman i Darrow, 1983).

La relació entre la melatonina i el son és complexa. Tots els animals produeixen melatonina per la nit, però el pic d'aquesta hormona no sempre coincideix amb el son, ja que les rates i la resta d'animals nocturns dormen durant el dia. Que la melatonina no

és necessària per a dormir també es demostra en animals pinealectomitzats, però per altra banda, sí que l'administració de melatonina i dels seus anàlegs ocupa un lloc important en el tractament de diversos problemes d'insomni i s'utilitza com a estabilitzador del son. De fet, en humans hi ha una estreta relació temporal entre la melatonina, la temperatura i el son, de manera que el pic de melatonina en sang coincideix amb el mínim de temperatura i se sap que la producció de melatonina augmenta un temps abans de l'inici del son (Kennaway i Wright, 2002).

### **2.1.3. Gens rellotge**

En els darrers anys s'han fet molts progressos en el coneixement de la maquinària molecular del rellotge gràcies al desenvolupament de tècniques de biologia molecular. S'ha trobat que les cèl·lules dels NSQ contenen diversos gens, denominats GENS RELLOTGE, que presenten una expressió circadiària i interaccionen amb els altres gens a través d'una sèrie de cicles per retroacció entre els gens i les proteïnes que expressen (Kuhlman i McMahon, 2006). Així, en el cycle principal els elements positius del cycle inclouen la transcripció de CLOCK i BMAL1 que, un cop dimeritzades, entren al nucli i activen l'expressió dels gens *period* (*Per1*, *Per2* o *Per3*) i *criptocrom* (*Cry1* i *Cry2*). La retroacció negativa es realitza pels heterodímers PER:CRY que inhibeixen la seva pròpia transcripció actuant sobre el

complex CLOCK:BMAL1. El resultat dels cicles de retroacció és l'oscil·lació dels nivells d'ARNm i de proteïnes dels gens rellotge i dels gens controlats pel rellotge, amb un període proper a 24 hores. Actualment s'han identificat en el ratolí més de 14 gens rellotge (Ko i Takahashi, 2006).

El coneixement de la maquinària molecular del rellotge és important ja que si es pogués conèixer tots els nivells dels diferents gens en un moment donat es podria conèixer quina és l'hora real del rellotge circadiari. De moment, podem saber, per exemple, que si es troben nivells alts de *Per* i nivells baixos de *Bmal* el rellotge es troba al seu dia subjectiu, mentre que nivells baixos de *Per* i alts de *Bmal* indicarien una nit subjectiva.

Aquests gens s'han identificat també en altres estructures tant dins del SNC com en teixits perifèrics.

#### 2.1.4. Oscil·ladors perifèrics

Tot i que el NSQ és el principal marcapassos del cos, s'han trobat gens rellotge expressats en altres zones del cervell, com el còrtex cerebral i l'hipocamp (Abe *et al.*, 2001a; Abe *et al.*, 2001b; Dudley *et al.*, 2003; Kriegsfeld *et al.*, 2003; Mrosovsky *et al.*, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2001), i també en diversos òrgans perifèrics, com el fetge, el cor, el pulmó i el múscul (Balsalobre, 2002; Balsalobre *et al.*, 1998; Damiola *et al.*, 2000; King *et al.*, 1997; Reppert i Weaver, 2002; Sakamoto *et al.*,

1998; Schibler i Sassone-Corsi, 2002; Stokkan *et al.*, 2001; Takahashi i Zatz, 1982; Tei *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 2000; Zylka *et al.*, 1998).

La resposta davant un canvi de fase al cicle LD és diferent en funció del teixit: mentre que el NSQ s'adapta completament després del primer cicle, els teixits perifèrics canvien més lentament i de forma diferent entre ells (Yamazaki *et al.*, 2000).

Els rellotges perifèrics perden el ritme en absència del NSQ, però poden ser encarrilats per l'aliment o per l'estimulació hormonal (Balsalobre *et al.*, 2000; Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001).

##### 2.1.4.1. Oscil·ladors sincronitzats per alimentació restringida

L'any 1986, Stephan va suggerir la idea de diferenciar els ritmes controlats pel NSQ (ritmes encarrilats per la llum), dels ritmes encarrilats per l'aliment, anomenant LEP (*LIGHT-ENTRAINABLE PACEMAKER*) al marcapassos encarrilat per la llum i FEP (*FOOD-ENTRAINABLE PACEMAKER*) a l'encarrilat per l'aliment. Més tard, es va canviar la denominació del FEP per la de FEO (*FOOD-ENTRAINABLE OSCILLATOR*), reservant la paraula *pacemaker* (marcapassos) exclusivament per al NSQ. D'una banda, experiments realitzats amb animals sotmesos a alimentació restringida (Stephan, 2002), el NSQ dels quals havia estat destruït quirúrgicament (Clarke i Coleman, 1986; Mistlberger, 1992b; Stephan *et al.*, 1979a; Stephan *et al.*, 1979b) van posar en evidència l'existència

real del FEO i de la seva manifestació, l'FAA. A més, la persistència de l'FAA durant uns quants dies va demostrar que el FEO era un veritable oscil·lador, tot i que feble, ja que no s'expressava en condicions d'alimentació *ad libitum*. Per altra banda, experiments encaminats a estudiar l'acoblament entre el NSQ i el FEO van indicar que el primer exercia més efecte sobre el segon que no pas el segon sobre el primer (Stephan, 1986).

Però, on es troba localitzat el FEO? Estudis realitzats durant la dècada dels anys 70 van revelar la capacitat d'un animal amb el NSQ lesionat i que, per tant, era arrítmic, de respondre a un ritme de 24 hores de disponibilitat a l'aliment (Krieger *et al.*, 1977; Stephan *et al.*, 1979a; Stephan *et al.*, 1979b; Stephan, 1983). Això, juntament amb el posterior descobriment de l'existència de gens rellotge situats en teixits perifèrics, com el sistema digestiu, suggereix la possibilitat de localitzar el FEO en algun òrgan digestiu i fora del sistema nerviós central (SNC). Actualment s'ha postulat el fetge com a possible òrgan on s'allotja el FEO (Damiola *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2003b; Stephan 2002; Stephan, 2003) perquè interacciona amb la part del SNC involucrada en el procés de la ingestió i en el balanç energètic (Ángeles-Castellanos *et al.*, 2004), i també perquè els rellotges perifèrics del fetge són essencials pel comportament anticipant (Buijs i Kalsbeek, 2001). Hi han altres raons que inciten a pensar en el fetge com a possible òrgan on

s'alberguen els rellotges perifèrics. Una d'aquestes raons és que l'alimentació restringida, que no afecta la fase del NSQ ni la fase de la resta de teixits perifèrics o si ho fa en aquests últims és de manera més lenta, sí que canvia la fase de l'expressió genètica del fetge, la qual cosa indicaria que aquest òrgan s'acobla directament per la ingesta d'aliment, a diferència dels altres oscil·ladors central o perifèrics (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). En segon lloc, la llum exerceix una influència feble sobre el fetge, mentre que l'aliment és un *zeitgeber* fort per a aquest òrgan (Weinert, 2005). Tot i així, el mecanisme pel qual l'aliment sincronitza els rellotges perifèrics encara no està clar. De fet, no se sap si és l'alimentació o el dejú aplicats de forma rítmica qui imposa la fase en els oscil·ladors perifèrics; ambdós hi podrien participar (Davidson *et al.*, 2002; Schibler i Sassone-Corsi, 2002).

És important comentar, però, que en absència d'altres *zeitgebers*, per exemple en fosc constant, l'ALIMENTACIÓ RESTRINGIDA (*RESTRICTED FEEDING* – RF) pot encarrilar el ritme circadiari conduït pel NSQ. No obstant, l'encarrilament depèn de l'espècie (Castillo *et al.*, 2004; Coleman *et al.*, 1982; Holmes i Mistlberger, 2000; Mistlberger, 1993; Mistlberger, 1994), de la proximitat que hi hagi entre el període del cicle RF i el període del curs lliure (Stephan, 1983) i de la durada de l'RF (Cambras *et al.*, 1993).

### 3. RITMES CIRCADIARIS ESTUDIATS EN AQUESTA TESI

#### 3.1. Activitat motora

En estudiar els ritmes circadiaris, cal triar adequadament la variable a utilitzar. És important que la variable analitzada presenti una sèrie de característiques que ens permetin fer l'estudi d'una manera senzilla i precisa. Cal que sigui una variable fàcil de mesurar, que puguem obtenir-ne mostres de manera simple i el més freqüent possible. També és molt important que el mostreig no interfereixi en el comportament de l'animal i per últim, és clar, que puguem disposar dels aparells que ens faran possible la presa de mostres.

Fins a l'inici d'aquesta tesi, en el laboratori de Cronobiologia de la Facultat de Farmàcia (Universitat de Barcelona), sempre s'havia emprat la variable ACTIVITAT MOTORA (AM), mesurada mitjançant actímetres de raigs infrarojos, per a l'estudi de ritmes circadiaris. És per això, donat que ja disposàvem dels aparells i de la infraestructura necessaris, que vam partir d'aquesta variable per fer tots els experiments i, per tant, aquesta serà la variable de referència en cadascun dels treballs. Més tard vam analitzar les variables temperatura i conducta de beguda, simultàniament a l'activitat motora, en els nostres estudis.

#### 3.2. Temperatura

La termoregulació és el conjunt de processos a través dels quals l'organisme manté la temperatura corporal dins uns marges per tal d'aconseguir un correcte funcionament cel·lular (Gilbert *et al.*, 2004).

En els mamífers, la TEMPERATURA CORPORAL (TEMP) està regulada per dos mecanismes: un mecanisme homeostàtic i un procés circadiari que genera una oscil·lació de temperatura corporal amb un període proper a 24 hores. Com a éssers homeotèrmics que són, mantenen una temperatura interna pràcticament constant amb oscil·lacions circadiàries dins d'uns marges molt estrets. El ritme de temperatura corporal és endogen ja que en condicions constants el ritme persisteix (Refinetti i Menaker, 1992). Per altra banda, el mecanisme termoregulador aconsegueix aquesta homeotèrmia gràcies a l'existència d'un balanç perfecte entre la producció i l'eliminació de calor del cos.

La temperatura central del cos humà oscil·la, amb una amplitud aproximada d'1°C, al llarg del dia, amb un període proper a 24 hores, essent el mínim a la matinada i el màxim a la tarda.

En els animals nocturns, el màxim de temperatura se situa a la nit (Brück, 1993), la qual cosa podria fer pensar que l'augment de temperatura és únicament conseqüència de l'activitat locomotora de l'animal, o bé que aquesta sincronia entre els dos ritmes és deguda a que ambdós són

controlats per la mateixa estructura. Diversos estudis, però, contradiuen aquestes hipòtesis.

Honma i Hiroshige (1978) van indicar que el ritme de temperatura no era conseqüència del ritme d'activitat perquè, en primer lloc, el ritme de temperatura, tant en persones com en animals, presenta un avançament de fase respecte el ritme d'activitat, la qual cosa vol dir que la temperatura comença a augmentar una mica abans que l'individu es desperti i iniciï la seva activitat diària.

El ritme de temperatura és independent del ritme d'activitat motora, però ambdós depenen del NSQ, ja que lesions al NSQ eliminen tant el ritme d'AM com el de TEMP. Tot i així, s'ha vist (Scheer *et al.*, 2005) que, mig any després d'una lesió al NSQ, els cicles de LD de 24h poden induir un ritme circadiari en la TEMP, però no en l'AM. Això suggereix que altres estructures, en absència del NSQ, poden enviar informació de llum (emascarament) sobre la TEMP, i que es necessita un cert temps perquè aquestes estructures cerebrals puguin activar-se.

### 3.3. Conducta de beguda

La CONDUCTA DE BEGUDA (B) s'explica per tres mecanismes diferents: per un mecanisme de tipus homeostàtic, segueix un ritme circadiari i va associada al consum d'aliments (Johnson i Johnson, 1997).

El mecanisme homeostàtic es basa en què els canvis de pressió osmòtica produïts

per la diferent concentració de sals donen lloc a canvis en el volum cel·lular, la qual cosa activa els osmoreceptors que envien informació a nivell de receptors centrals (Bourque *et al.*, 1994).

Pel que fa al ritme circadiari de conducta de beguda, s'ha observat com rates en curs lliure segueixen un ritme de B proper a 24h i quan els mateixos animals són sotmesos a un cicle LD de 24h aquest ritme encarrila amb el cicle extern (Johnson i Johnson, 1997). També s'ha comprovat que l'ablació del NSQ dona lloc a la pèrdua d'aquest ritme (Satinoff i Prosser, 1988).

Per últim, no es pot oblidar el lligam fisiològic que hi ha entre la conducta de beguda i el consum d'aliment. En les rates, la major part d'aigua ingerida s'associa al moment dels àpats, de manera que el 75% d'aigua ingerida al llarg d'un dia té lloc entre 10 min abans, durant i 30 min després d'un àpat (Johnson i Johnson, 1990) i la quantitat d'aigua consumida correlaciona positivament amb la quantitat d'aliment ingerit (Fitzsimons i Le Magnen, 1969; Johnson i Johnson, 1990).

Una diferència important entre els ritmes de conducta de beguda i de consum d'aliment és que mentre la disponibilitat d'aliment pot actuar com un "possible *zeitgeber*", la disponibilitat d'aigua, no (Moore-Ede *et al.*, 1982); de fet, la beguda administrada de forma restringida unes hores al dia no sincronitza els ritmes circadianis de les rates (Mistlberger, 1992a; Moore, 1980).

#### 4. MANIPULACIÓ DEL SISTEMA CIRCADIARI

Tal i com veurem més endavant, hi ha situacions que alteren el sistema circadiari. En les persones, això pot produir una sèrie de trastorns. És per aquest motiu que es fa necessària la cerca de fàrmacs o tractaments que puguin restablir el correcte funcionament d'aquest sistema quan es presenti alterat, i al mateix temps doni informació sobre com pot manipular-se el sistema circadiari. El terme cronobiòtic fa referència a la substància química o a l'agent (Redfern *et al.*, 1994) que afecta específicament la regulació fisiològica de l'estructura temporal (Simpson, 1980), reencarrilant els ritmes circadiaris dissociats o desincronitzats (Short i Armstrong, 1984). Originàriament aquesta definició implicava l'actuació de la substància cronobiòtica directament sobre el NSQ; actualment, es considera cronobiòtic l'agent que actui a qualsevol nivell d'entrada del sistema circadiari: sobre el NSQ pròpiament, als mecanismes d'encarrilament, modificant l'acoblament, a nivell d'oscil·ladors perifèrics, sobre les vies de sortida que retornen fent *feedback* sobre el NSQ, etc. (Touitou i Bogdan, 2007).

A continuació comentarem els diferents tractaments que hem emprat en aquesta tesi per tal de manipular el sistema circadiari:

🐛 La **MELATONINA** actua a nivell del NSQ modulant la seva activitat i influint sobre els ritmes circadiaris.

L'administració de polsos de melatonina provoca canvis de fase dels ritmes

circadiaris (Lewy *et al.*, 1992; Sumová i Illnerová, 1996), facilita l'encarrilament a un nou cicle LD i altera l'activitat metabòlica del NSQ. Si és administrada al final del dia subjectiu (al vespre), produeix un avançament de fase, mentre que l'administració a l'inici del dia subjectiu (a l'alba) produeix un retard de fase (Dubocovich *et al.*, 1996; Lewy *et al.*, 1995).

En alteracions que estan directament relacionades amb la disfunció o desincronització dels ritmes circadiaris, com: alguns tipus de ceguera, el *jet-lag*, els canvis de torn de treball o les depressions estacionals (*seasonal affective disorder – SAD*), l'administració de melatonina podria resincronitzar els ritmes (Arendt *et al.*, 1997; Lewy *et al.*, 2005; Rajaratnam i Arendt, 2001). Això explicaria els beneficis que pot produir aquesta substància reduint la severitat dels símptomes o la durada del *jet-lag* (Parry, 2002).

A banda de l'efecte que exerceix sobre el sistema circadiari, la melatonina és també immunomoduladora, antioxidant, oncostàtica, antidepressiva (alguns tipus de depressió cursen amb una alteració en els nivells de melatonina) (Srinivasan *et al.*, 2006), té efecte sobre malalties cardiovasculars, sobre l'os, participa en la regulació de la despesa energètica i en la regulació de la massa corporal i també actua sobre la reproducció i la maduració sexual (Pandi-Perumal *et al.*, 2006).

🐛 El NSQ està format per un gran nombre de neurones que contenen GABA;



com a conseqüència, els agents que afecten la neurotransmissió GABAèrgica afecten també la ritmicitat circadiària (Subramanian i Subbaraj, 1993). Els receptors GABAèrgics són la diana d'un ampli ventall de fàrmacs que actuen a nivell de SNC, com: ansiolítics, hipnòtics, sedants, anestèsics generals i anticonvulsivants (Macdonald i Olsen, 1994). En hámsters, s'ha observat que les substàncies que afecten la neurotransmissió GABAèrgica poden bloquejar els canvis de fase del ritme d'activitat locomotora induïts per la llum (Ralph i Menaker, 1989). Per exemple, el **DIAZEPAM (DZP)**, que és una benzodiazepina que potencia la neurotransmissió GABAèrgica a través de l'acció sobre receptors GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínic, bloqueja els avançaments de fase induïts per la llum, però no els retards (Ralph i Menaker, 1986), mentre que la bicuculina, que és un antagonista del GABA, bloqueja els retards de fase induïts per la llum, però no els avançaments (Ralph i Menaker, 1985). En ratolins, el DZP també provoca canvis de fase, avançaments o retards, en funció de l'hora en què s'hagi administrat (Subramanian i Subbaraj, 1993) i facilita la resincronització dels ritmes circadianis (Childs i Redfern, 1981).

🐛 El **XOC ELECTROCONVULSIU (XEC)** s'utilitza com a model experimental de la teràpia electroconvulsiva (TEC), que és un tractament eficaç contra els símptomes de la depressió severa i es basa en l'aplicació aguda o crònica de XECs. Actua principalment en l'hipocamp i en l'escorça

(Blier *et al.*, 1998; Blier i de Montigny, 1998; Mongeau *et al.*, 1997) però no podem descartar que actui sobre altres zones, com el NSQ de l'hipotàlem. Requereix l'aplicació d'una estimulació intensa perquè el crani aïlla la corrent elèctrica i només una petita part de l'aplicada passa a l'interior del cervell (Zyss, 1994). La intensitat de l'estimulació produeix convulsions de tipus tònic-clònic, seguides d'una pèrdua de consciència que dura pocs segons. Per això, quan s'aplica a humans, la TEC requereix anestèsia general. També pot produir pèrdua transitòria de memòria (Khan *et al.*, 1993).

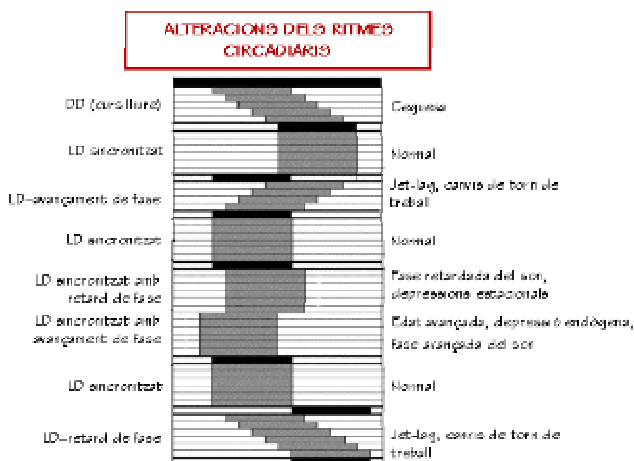
🐛 Altres agents cronobiòtics són: la llum brillant, que s'ha demostrat el seu efecte en problemes de dèficit d'atenció i d'hiperactivitat, en trastorns del ritme de son-activitat (Ho *et al.*, 2002) i en depressions estacionals (Rybak *et al.*, 2006); les benzodiazepines, hipnòtics i antidepressius, però cal anar amb compte amb aquestes substàncies ja que més que activitat cronobiòtica, el que tenen la majoria, és un efecte sedant, la qual cosa pot dificultar la diferenciació entre les dues accions del fàrmac (Touitou i Bogdan, 2007). El mateix succeeix amb el grup de substàncies estimulants, com la cafeïna i l'amfetamina (Schwartz i Roth, 2006).



## 5. ALTERACIONS DELS RITMES BIOLÒGICS

Els ritmes biològics poden presentar alteracions en el període, en l'amplitud, en la fase o en l'estabilitat de la fase diària.

En humans, la majoria d'alteracions dels ritmes biològics (Figura I-8), com el *jet-lag*, els canvis de torn de treball, la síndrome de la fase retardada del son, la síndrome de la fase avançada del son, etc. cursen amb trastorns del cicle son-vigília, on sovint s'observen alteracions de la fase del ritme (Touitou i Bogdan, 2007).



**Figura I-8.** Alteracions dels ritmes circadianis. La barra negra representa la foscor; la barra grisa, l'activitat (adaptat d'Arendt i Skene, 2005).

Per altra banda, els ritmes circadianis presenten una relació de fase entre ells seguint un ordre intern, que es veu modificada en una sèrie de situacions<sup>3</sup>, i és llavors quan es desincronitzen.

Sota determinades patologies els ritmes circadianis també poden presentar alteracions de l'amplitud. Alguns autors

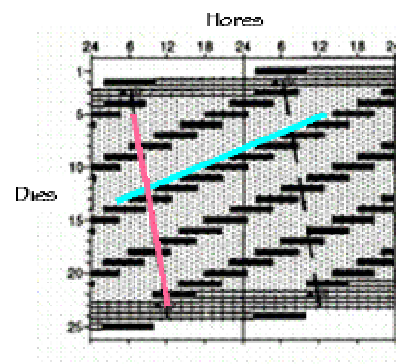
<sup>3</sup> Veure apartat 5.1.

suggereixen que la depressió és una malaltia en el transcurs de la qual es pot observar una disminució de l'amplitud dels ritmes de cortisol i de tirotròpina (Souetre *et al.*, 1986; Souetre *et al.*, 1988).

### 5.1. Desincronització de ritmes

La SINCRONITZACIÓ INTERNA és la situació en la qual la relació de fases que s'estableix entre les diverses variables de l'organisme que varien rítmicament és constant. A vegades, però, uns ritmes circadianis espontàniament es desincronitzen dels altres. Aquesta desincronització interna pot ser induïda, en humans, a través de dos protocols diferents. En ambdues situacions es pot observar com els ritmes d'activitat o de son-vigília i de temperatura presenten diferent període (Czeisler *et al.*, 1999; Wever, 1979).

DESINCRONITZACIÓ FORÇADA. En aquest protocol (Figura I-9), el cicle de LD i el cicle d'activitat-repòs que li ve associat són allargats o escurçats artificialment.



**Figura I-9.** Desincronització forçada en un individu sotmès a un cicle de 20h. La línia de color verd representa el ritme de son-vigília i la línia de color rosa, el ritme de temperatura (Czeisler *et al.*, 1999).

Si la llargada del cicle imposat és fora del marge d'encarrilament, el ritme circadiari de temperatura corporal i el de les altres variables fisiològiques van en curs lliure, oscil·lant amb el període endogen, mentre que el cicle d'activitat-repòs/sonvigília continua sincronitzat amb el medi ambient (Czeisler *et al.*, 1999).

Sota aquest protocol, la persona és "forçada a viure" un dia que no té 24 hores. Normalment s'imposa un dia de 21 o de 28 hores (Hanneman, 2001; Zee i Turek, 1999).

AÏLLAMENT. En aquest cas, es manté la persona objecte d'estudi aïllada de qualsevol referència temporal. Les condicions de temperatura, humitat, soroll i il·luminació també s'han de mantenir constants. Aquest protocol s'utilitza per estudiar ritmes en curs lliure. Experiments fets en persones, seguint aquest tipus de protocol han demostrat que el tau de les persones és superior a 24 hores i proper a 25 hores (Wever, 1979).

La desincronització entre els ritmes d'activitat i de temperatura és un fenomen que es dona en l'espècie humana en determinades circumstàncies com el *jet-lag*, els canvis de torn de treball o alguns tipus de trastorns afectius. També, moltes persones cegues presenten desincronització dels seus ritmes biològics.

Aquestes situacions provoquen en els individus que ho pateixen un conjunt de símptomes, com: l'insomni, els trastorns gastrointestinals, la disminució de l'atenció i dels reflexes, etc. que interfereixen i, en la

majoria dels casos dificulten, la realització de les seves tasques diàries.

### **JET-LAG**

El *JET-LAG* és el trastorn associat als vols que impliquen el creuament de diversos fusos horaris, produint-se una desincronització entre el rellotge circadiari de l'individu i el nou ambient. El cansament provocat pel viatge juntament amb l'adaptació horària que ha de fer la persona que realitza aquests tipus de desplaçaments un cop està a la zona geogràfica d'arribada, es tradueix en una sèrie de símptomes. La fatiga, l'insomni, el malestar gastrointestinal, la disminució de la concentració i la irritabilitat (Siegel *et al.*, 1969) que experimenten aquestes persones són deguts a què el rellotge circadiari té una velocitat d'adaptació limitada per adequar-se al nou horari i també a què les diverses variables de l'organisme resincronitzen a diferent velocitat (Moore-Ede *et al.*, 1977; Tapp i Natelson, 1989). Això implica que, a banda d'una desincronització externa (entre el cos i el medi ambient), també es produeix una desincronització interna (entre les diverses variables de l'organisme). Aquests símptomes van desapareixent a mesura que el rellotge circadiari s'ajusta a la nova hora local.

Diversos estudis han conclòs que per a què es produeixi la resincronització entre els ritmes de les diferents variables es necessita aproximadament un dia per cada hora de desfasament (Takamura *et al.*, 1991).

### CANVIS DE TORN DE TREBALL

Els CANVIS DE TORN DE TREBALL sovint produeixen un malestar caracteritzat per somnolència, incapacitat de concentració durant les hores de treball i dificultat per dormir durant les hores apropiades (Rajaratnam i Arendt, 2001). Moltes persones, a més, experimenten molèsties gastrointestinals (Caruso *et al.*, 2004).

El que succeeix en els canvis de torn de treball és diferent del que es produeix en el cas del *jet-lag*. Ara, es produeixen canvis d'horari contínuament que impedeixen l'encarrilament complet al cicle extern de LD (Refinetti, 2006).

### TRASTORNS AFECTIUS

La depressió és un trastorn que cursa amb una alteració de les funcions emocionals, cognitives, autonòmiques i endocrines (Dremencov *et al.*, 2003), i també, en molts casos, amb alteració de ritmes biològics (Healy i Waterhouse, 1995). De fet, s'ha descrit que molts pacients que pateixen depressió presenten modificacions en l'amplitud i en la fase dels ritmes de son-vigília, dels nivells de cortisol, de secreció de melatonina i de temperatura corporal (Ford i Kamerow, 1989; Kripke, 1983; Rubin *et al.*, 1992; Wehr *et al.*, 1979). Però, quina relació existeix entre la depressió i els ritmes circadianis? De fet, encara no s'ha trobat una resposta concloent a aquesta qüestió. S'ha suggerit que una disfunció en les vies serotoninèrgiques, que van del nucli del Rafe al NSQ, podria ser el lloc anatòmic a través

del qual els trastorns afectius alterarien el sistema circadiari humà, però avui en dia encara no s'ha pogut comprovar. En el mateix sentit, s'ha postulat que els ritmes circadianis i la depressió implicarien els mateixos NT. Per exemple, s'ha vist que les concentracions de serotonina són molt altes en el NSQ (Moore i Speh, 2004; Wirz-Justice, 2005). A més, en els humans, la quantitat de serotonina varia durant el dia i al llarg de l'any (Carlsson *et al.*, 1980; Lambert *et al.*, 2002; Wirz-Justice i Richter, 1979), i l'exposició a la llum estimula la funció serotoninèrgica (Lambert *et al.*, 2002).

Els tractaments tradicionals per a la depressió no tenen en compte els principis de la fisiologia del sistema circadiari, sinó que es basen en l'administració de psicòtrops, com els inhibidors selectius de la recaptació de serotonina, en la psicoteràpia o en la TEC.

### CEGUESA

Les persones invidents sovint presenten alteracions circadianes que es produeixen perquè el seu rellotge és incapaç d'ajustar-se al dia solar (Waterhouse *et al.*, 2006). És a dir, en molts casos, a aquestes persones els manca la informació aferent de tipus fòtic i, com a conseqüència, "van en curs lliure" i no poden encarrilar al cicle extern (Korf *et al.*, 2003), encara que s'exposen regularment a les senyals socials (Emens *et al.*, 2005).

Un dels principals trastorns que pateixen les persones cegues és l'insomni durant la nit i la conseqüent somnolència

durant el dia (Lockley *et al.*, 1999), que molts cops no és identificat, ni per la persona que ho pateix ni pel seu metge, com un problema diferent de l'insomni provocat per la depressió o per altres causes. Però no totes les persones cegues pateixen insomni; n'hi ha una part que perceben almenys una petita quantitat de llum, i n'hi ha d'altres que, tot i no captar gens de llum, mantenen intacta la via fòtica d'entrada (Sack i Lewy, 2001).

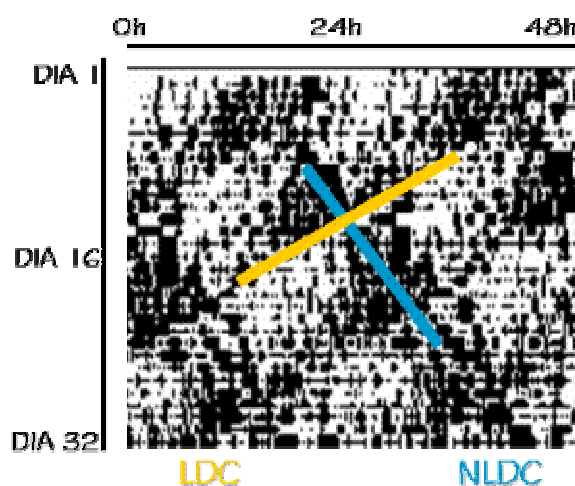
S'ha descrit també, en aquest col·lectiu de persones, el curs lliure dels ritmes de cortisol, de melatonina i de temperatura corporal (Sack *et al.*, 1992).

## 5.2. Dissociació del nucli supraquiasmàtic

Acabem de veure que els éssers humans, sota determinades circumstàncies, pateixen desincronització entre els ritmes de les diferents variables de l'organisme. Per tal d'estudiar aquest fenomen, s'ha creat un model animal que simularia una situació semblant. Mitjançant aquest model, de desincronització forçada, es sotmet un animal, en el nostre cas la rata, a cicles de LD diferents del que es pot trobar a la natura, per exemple cicles de 22 o de 23 hores. Però aquest model no és l'únic. Honma *et al.*, l'any 1986 en van descriure un altre en el qual rates tractades crònicament amb metamfetamina en aigua de beguda presentaven un ritme circadiari d'AM de període llarg (aproximadament de 30h) i en

coordinació relativa amb el cicle LD, i en algunes rates, apareixien dos components, un que seguia el cicle LD i l'altre, en curs lliure.

En el cas del nostre model, quan les rates són sotmeses a cicles LD de 22 o 23 hores, la seva activitat motora presenta dos ritmes circadiaris simultanis (Figura I-10). Un ritme segueix el cicle extern de LD, mentre que l'altre ritme segueix en curs lliure amb un període proper a 25 hores. Això ho interpretem com la manifestació de dos grups d'oscil·ladors dins del sistema circadiari: un grup capaç d'encarrilar amb el cicle extern, i l'altre incapaç de fer-ho, la qual cosa implica que sota determinades condicions externes, el sistema circadiari pot ser dissociat de manera que aparegui un COMPONENT DEPENDENT DE LA LLUM o *LIGHT-DEPENDENT COMPONENT (LDC)* i un COMPONENT NO DEPENDENT DE LA LLUM o *NON-LIGHT-DEPENDENT COMPONENT (NLDC)* (Campuzano *et al.*, 1998).



**Figura I-10.** Doble-gràfica on s'observa un patró de dissociació. En color groc es representa el LDC i en color blau, el NLDC.

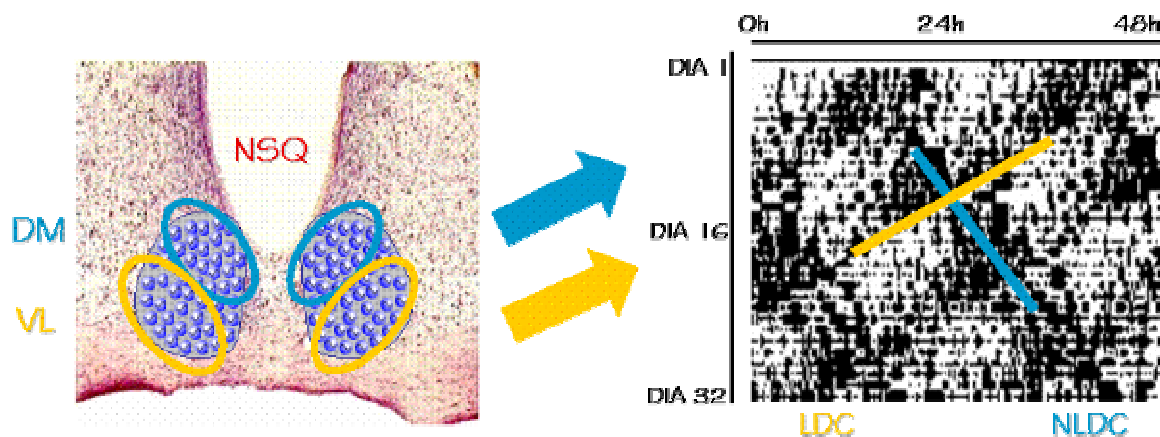
Quan els animals tornen a estar sota condicions de FOSCOR CONSTANT o *DARK-DARK* (DD), únicament manifesten un sol ritme.

Les anàlisis de l'expressió genètica del NSQ sota condicions de T22 fetes per de la Iglesia *et al.* l'any 2004 van suggerir que els dos ritmes d'activitat motora, manifestats sota condicions de T22, eren el reflex de l'activitat separada de les dues subdivisions del NSQ: la part VL i la part DM. Mesurant l'expressió dels gens *Per1* i *Bmal* per hibridació *in situ*, es va poder determinar que el dia subjectiu del LDC corresponia amb l'expressió dels gens rellotge de la regió VL, mentre que el dia subjectiu del NLDC, amb la de la regió DM (Figura I-11). Concretament, durant el dia del LDC i la nit del NLDC augmentaven els nivells de *Per1* i disminuïen els de *Bmal* en la zona VL, mentre

que durant la nit del LDC i el dia del NLDC, augmentaven els de *Per1* i disminuïen els de *Bmal* en la zona DM.

El fenomen de la dissociació no és comú a totes les espècies ja que, per exemple, no s'ha pogut descriure en ratolins ni en hámsters, els quals presenten *splitting*, per citar alguns dels animals més utilitzats en el laboratori.

Creiem que aquest model de dissociació de la rata pot ser un bon model per estudiar la desincronització de ritmes que es produeix en l'espècie humana sota determinades circumstàncies i, a partir d'ell, fer diversos estudis encaminats a trobar algun tractament que sigui capaç d'acoblar el sistema circadiari un cop s'ha produït la desincronització.



**Figura I-11.** Regions del NSQ i components que dirigeixen: la part VL dirigeix el LDC i la part DM, el NLDC.

