



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

II. OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu d'aquesta tesi és l'estudi de la dissociació en diferents variables fisiològiques, entenent aquest fenomen com la manifestació simultània, en la mateixa variable, de dos ritmes circadianis de diferent període. Atès que aquest fenomen apareix en la rata quan és sotmesa a cicles circadianis de llum-foscors inferiors a 24 hores, hem utilitzat diversos grups de rates Wistar exposant-los a cicles LD de 22 i 23 hores.

També ens hem proposat trobar tractaments capaços de revertir la dissociació.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

- Estudiar els ritmes de diverses variables fisiològiques i observar si experimenten dissociació.**

Hem analitzat les variables activitat motora, temperatura corporal, conducta de beguda i melatonina en rates Wistar sotmeses a cicles de llum-foscors de 22 i 23 hores. L'última variable únicament s'ha estudiat en cicles LD de 22 hores.

- Estudiar la influència que exerceix el període del cicle LD al qual l'organisme ha estat sotmès durant l'alletament en la posterior aparició del fenomen de la dissociació.**

Hem analitzat els efectes dels cicles LD de 22, 23 i 24 hores durant l'alletament, sobre el posterior desenvolupament de la dissociació, en els ritmes d'activitat motora i temperatura.

- Provar diferents tractaments que modifiquin els components rítmics del patró dissociat.**

Hem analitzat l'efecte que produeix l'administració de melatonina, de diazepam i de xocs electroconvulsius en rates exposades a cicles LD de 22 hores i d'alimentació restringida a cicles LD de 22 i 23 hores.

III. MATERIAL I MÈTODES

1. ANIMALS

Per dur a terme els experiments d'aquesta tesi es van utilitzar rates Wistar de sexe i edat diferent en funció de les necessitats de cada experiment, procedents de Charles River (França).

2. CONDICIONS DE MANTENIMENT

Els animals que composaven cada grup experimental van ser col·locats en diferents cabines aïllades acústicament, lumínicament i tèrmica de l'exterior. El conjunt de les instal·lacions consta de vuit cabines, disposades en dos grups de quatre i separades per un passadís central. Cada cabina disposa de quatre prestatges, la qual cosa permet distribuir fins a un màxim de vint animals per cabina.

Cada rata va ser col·locada en una gàbia transparent de policarbonat, de mides 25x25x12 cm (Panlab), que té com a sostre una reixa d'acer inoxidable, on a sobre s'hi col·loca l'aliment i l'abeurador.

Van ser alimentades amb pinso comercial (A04 Panlab i Harlan Global Diet 2014) i la beguda va ser sempre aigua de l'aixeta.

La neteja i desinfecció de les gàbies es va dur a terme, aproximadament, un cop per setmana en el passadís situat entre les cabines i sense alterar mai les condicions d'il·luminació, evitant interferir en el desenvolupament dels experiments.

3. IL·LUMINACIÓ DE LES CABINES

Per simular les condicions diürnes (de llum), les cabines estaven dotades de dos fluorescents de llum blanca, situats davant de les gàbies, que donaven una intensitat d'aproximadament 300 lux. Les condicions nocturnes (de fosc) es van simular a través de llums de neó de color vermell, d'una intensitat total d'aproximadament 0,1 lux.

El control de la il·luminació es va realitzar des de l'exterior de les cabines per evitar la interrupció de les condicions experimentals.

4. MESURA DE LES VARIABLES FISIOLÒGIQUES

4.1. Activitat motora

L'activitat motora de cada un dels animals es va mesurar mitjançant els actímetres. Un actímetre és un aparell, en forma de marc, que conté dos feixos d'infraroig perpendiculars que es tallen en el pla. Al centre s'hi col·loca la gàbia amb l'animal. Cada vegada que l'animal es mou dins la gàbia i talla un dels dos feixos de llum, l'aparell fa un comptatge. La llum infraroja és invisible per als animals utilitzats en aquests experiments.

Les dades d'AM enregistrades es van acumular amb intervals de temps diferents en funció de l'experiment. Totes aquestes dades es van emmagatzemar en un ordinador situat a l'exterior de les cabines,

la qual cosa permet controlar els arxius sense necessitat d'interferir en les condicions experimentals.

4.2. Temperatura

El ritme de temperatura corporal va ser enregistrat utilitzant sensors de temperatura. El *Thermochron iButton*[®] (Davidson *et al.*, 2003a) és un xip encapsulat d'acer inoxidable d'uns 16 mm de diàmetre i 4 mm d'alçada que es pot programar perquè gravi i emmagatzemi dades de temperatura. Cada sensor pot emmagatzemar fins a 2048 dades. Un lector que s'acobra a un port USB permet la programació del dispositiu, definint l'interval de temps en el qual es vol registrar les dades de temperatura així com el moment d'inici de la gravació i el buidat de les dades a l'ordinador. A més, aquests dispositius tenen l'avantatge de què, un cop ha acabat l'experiment, es poden reutilitzar en posteriors treballs. Un altre dels avantatges que presenta aquest aparell és que, com que no transmet les dades, no pot interferir amb el sensor de cap altre animal que estigui col·locat en un lloc pròxim. Per altra banda, aquest aparell presenta el desavantatge de què no es poden conèixer les dades al moment, sinó que cal esperar la fi de l'experiment per extreure el sensor de l'interior de l'animal.

4.3. Conducta de beguda

L'aparell que va permetre mesurar la conducta de beguda dels animals va ser dissenyat i construït en el nostre laboratori. Consta d'un feix infraroig situat on hi ha l'abeurador, de manera que cada vegada que l'animal s'apropa per beure, talla aquest feix de llum i l'aparell realitza un comptatge.

4.4. Melatonina

Les concentracions de melatonina en plasma es van determinar per la tècnica de RIA, utilitzant el kit comercial d'IBL i processant les mostres en un comptador gamma.

5. TRACTAMENTS

5.1. Administració de melatonina

Es va utilitzar melatonina (Sigma-Aldrich) a la dosi d'1mg/kg de pes corporal per dia, dissolta en una solució aquosa d'etanol al 0,1% i es va administrar en aigua de beguda. Prèviament s'havia mesurat el volum d'aigua begut per cada animal i s'havia calculat la ingesta mitjana d'aigua. A partir d'aquesta mesura es va calcular la concentració de MEL necessària per a l'aportació de la dosi desitjada. L'aigua de beguda va ser preparada i reemplaçada cada 2 dies. Els abeuradors van ser recoberts amb paper d'alumini per evitar el

contacte amb la llum. Per tal de verificar la dosi, es va mesurar el volum d'aigua begut per cada rata i, d'acord amb això, es va determinar la dosi de MEL administrada, que va resultar de $0,92 \pm 0,20$ mg/kg de pes corporal/dia.

5.2. Administració de diazepam

Es va administrar diazepam (Almirall-Prodesfarma) a una dosi de 2,5mg/kg de pes corporal/dia, dissolt en 0,1% de solució aquosa d'etanol. Durant els dies previs a l'administració es va mesurar el volum d'aigua begut per cada animal i es va calcular la ingesta mitjana d'aigua. A partir d'aquesta mesura es va calcular la concentració de DZP necessari per a l'aportació de la dosi desitjada. L'aigua de beguda va ser preparada i reemplaçada cada 2 dies. La dosi final de DZP, un cop verificada degut a la variabilitat interindividual detectada en el volum d'aigua begut, va ser de $2,20 \pm 0,49$ mg/kg de pes corporal/dia.

5.3. Administració de xocs electroconvulsius

Per administrar un xoc electroconvulsiu es va utilitzar un aparell de la marca Ugo Basile, model 57800-001, i es va procedir segons les instruccions del fabricant. Es va col·locar un elèctrode en forma de pinça a cada orella de l'animal i es va administrar

un XEC de les següents característiques: freqüència: 100polsos/s; amplada del pols: 0,5ms; durada: 1s; intensitat: 90mA.

6. INTERVENCIIONS QUIRÚRGIQUES

6.1. Implantació de sensors de temperatura

Per dur a terme la implantació dels sensors de temperatura es van anestesiàr els animals amb isofluorà, i tot seguit es va insertar, de forma intraperitoneal (ip), un o dos sensors de temperatura, en funció de l'experiment, dins de cada animal, mitjançant una petita incisió en la paret abdominal. Posteriorment es va suturar el lloc de la incisió, amb fil de sutura estèril.

6.2. Canulació de la vena jugular

Per tal d'obtenir mostres de sang freqüentment, prèviament es va canular la vena jugular de cada animal. Per dur a terme aquesta tècnica, primer cal anestesiàr cada rata amb ketamina-xilacina. Un cop adormida, se li afaiten les parts ventral i dorsal, i es col·loca l'animal sobre la superfície de cirurgia amb la cara ventral cap amunt. Es fixen les potes de l'animal a la superfície de treball i es fa una incisió longitudinal de 2-3cm, des de la clavícula fins a la pota anterior, a la part dreta del coll de l'animal. Es disseca 1cm de la jugular i se situen, a sota de la vena, 2 fragments de 20cm de fil de sutura. S'aguanta la vena

amb les pinces entre les dues sutures i es fa un tall en forma de V en la paret superior de la vena. Amb l'ajut d'una pinça vasodilatadora s'introdueix la cànula en el tall. S'injecten 200-250µL de solució salina estèril. Es lliga la cànula amb fil de sutura. S'injecten 100µL de solució estèril d'heparina. Es dona la volta a l'animal i, per la part dorsal, s'introdueix una agulla de 16-ga, fent-la sortir a prop de l'àrea d'inserció de la cànula amb la vena. Es fa passar la cànula a través de l'agulla fins que surt per la base, moment en el qual ja es pot treure l'agulla. Un cop comprovat que l'extracció de sang és factible, s'administra, a través de la cànula, solució salina heparinitzada amb 120µg/mL de gentamicina (500µL en rates). Es tapa la cànula amb una agulla, deixant-la sobresortir uns 2-3cm des de la pell. Per finalitzar, es dona la volta a l'animal, es neteja la ferida amb solució salina amb gentamicina i es sutura.

Per tal d'evitar que la cànula s'obturi, cal netejar-la diàriament amb solució salina heparinitzada.

6.3. Pinealectomia

La pinealectomia és la intervenció quirúrgica en la qual s'extirpa la glàndula pineal.

Per dur a terme aquesta intervenció, cada animal va ser prèviament anestesiats amb una injecció ip de ketamina (50mg/kg

de pes corporal) i xilacina (5mg/kg de pes corporal) i es va procedir segons el mètode de Hoffman i Reiter (1965). Cada animal, un cop anestesiats, es va col·locar en un aparell estereotàxic (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) i se li va fer un tall sagital a la pell del cap, per tal de deixar a la vista la sutura lambda. Amb l'ajut d'una broca circular es va perforar el crani al voltant de lambda i es va extreure delicadament l'os. Un cop l'os va ser retirat es va extirpar la glàndula pineal, que està localitzada per sota del sinus venós. Després d'un breu període d'hemostàsia, es va tornar a col·locar la part del crani extirpada i es va suturar la pell.

6.4. Gangliectomia

Mitjançant la gangliectomia s'extirpen els ganglis cervicals superiors. Després de l'anestèsia amb ketamina (50mg/kg de pes corporal) - xilacina (5mg/kg de pes corporal) administrada de forma ip es va dur a terme la intervenció seguint el mètode descrit per Reiter l'any 1968 segons el qual, després d'una incisió ventral al coll, cada gangli cervical superior és identificat en la bifurcació de l'artèria caròtida comuna, permetent així la seva eliminació.

7. TRACTAMENT I ANÀLISI DE LES DADES

7.1. Mètodes específics de Cronobiologia

7.1.1. Doble-gràfica (*double-plot*)

La doble-gràfica és un mètode gràfic que s'utilitza per representar les dades d'una variable. Aquesta eina permet, a l'ull humà, visualitzar ràpidament les característiques rítmiques d'aquesta variable.

Quan la variable representada és l'AM, la doble-gràfica pren el nom d'actograma (Figura III-1). L'actograma és una matriu on cada fila representa l'activitat d'un dia i cada columna indica el nombre de moviments acumulats durant un interval de temps determinat (p. ex. 15 min). Per visualitzar millor els ritmes existents, es dibuixa una còpia de la gràfica a la dreta, desplaçant-la una fila cap amunt.

Un cicle es pot dividir en dues parts: la part més fosca, o fase d'activitat (*alpha*) i la part més clara, o fase de repòs (*rho*) (Jud *et al.*, 2005).

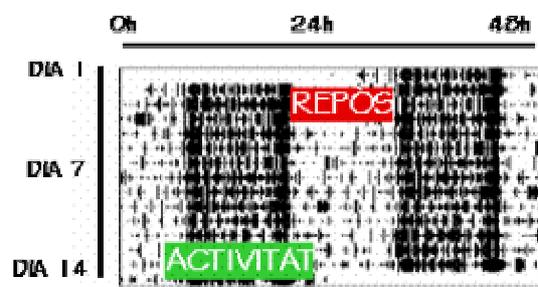


Figura III-1. Doble-gràfica d'activitat-repòs d'una rata. Les franges verticals fosques indiquen el temps durant el qual l'animal està actiu. Les franges clares mostren el temps de repòs.

La gràfica indica un ritme de 24 hores quan la franja d'activitat està completament vertical, la qual cosa vol dir que l'animal cada dia comença l'activitat a la mateixa hora. Quan la franja d'activitat es desplaça cap a l'esquerra, indica que l'inici d'activitat s'avança una mica cada dia i, per tant, el ritme té un període inferior a 24 hores, i si l'activitat es retarda cada dia una mica, la franja es desplaça cap a la dreta, essent llavors, el ritme superior a 24 hores (Figura III-2).

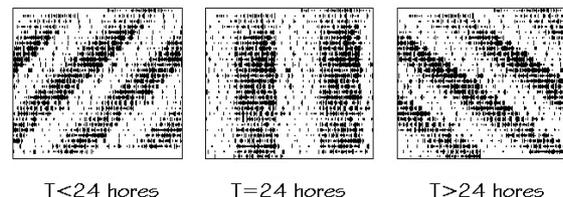


Figura III-2. Forma que presenta la doble-gràfica en funció del període del ritme. L'actograma de l'esquerra mostra un ritme de període inferior a 24 hores; el del centre, un ritme de període igual a 24 hores, i el de la dreta, un ritme de període superior a 24 hores.

7.1.2. Periodegrama de Sokolove-Bushell

El periodegrama de Sokolove-Bushell (Sokolove i Bushell, 1978) (Figura III-3) permet determinar el període del ritme o dels ritmes estadísticament significatius d'una sèrie temporal, així com el percentatge de variances (%V) explicat per aquest o aquests ritmes. Aquest %V és un indicador de l'estabilitat d'un ritme.

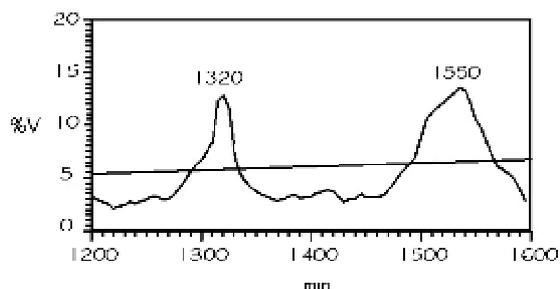


Figura III-3. Periodegrama de Sokolove-Bushell. A l'eix vertical s'hi representa el %V i a l'eix horitzontal, el temps (en minuts). En aquest exemple s'observen 2 pics significatius: un a 1320 minuts i un altre a 1550 minuts.

Es tracta d'una gràfica en la que en absisses s'hi representen els períodes i en ordenades, el %V explicat per cada període de la sèrie temporal.

La presència de pics a la gràfica permet conèixer el o els períodes dels ritmes que es troben presents a la sèrie temporal. A la gràfica també s'hi inclou una línia que assenjala el nivell de significació corresponent a una p de 0,05, de tal manera que només es consideren significatius els pics que superin aquesta línia (Díez-Noguera, 2006).

7.1.3. Ona mitjana

L'ona mitjana dibuixa el perfil característic del ritme per a un determinat període (Figura III-4).

A través de la seva observació i la seva anàlisi podem determinar algunes de les característiques del ritme, com la durada de les fases alfa (activitat) i rho (repòs) (Díez-Noguera, 2006).

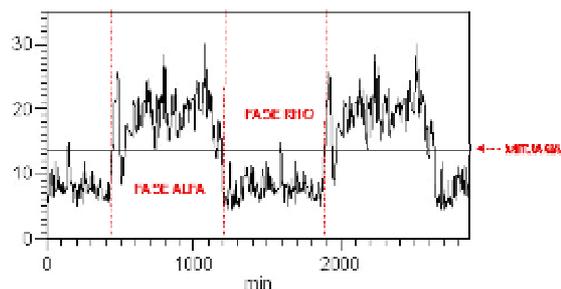


Figura III-4. Ona mitjana d'un ritme.

De la forma d'ona, també se'n poden calcular les següents variables: r : és el coeficient de correlació entre la forma d'ona i la sèrie original de dades; A : és l'àrea de l'oscil·lació de les dades al voltant de la mitjana i es calcula sumant els valors absoluts de les diferències entre la mitjana i cada dada de la forma d'ona; $\%A$, és el valor d' A expressat com a percentatge de l'àrea sota la corba total. Aquesta variable expressa el grau d'oscil·lació d'un ritme determinat, per això considerem que és la que millor indica la importància d'un ritme en la distribució del conjunt de dades.

7.1.4. Test de Rayleigh

El test de Rayleigh (Figura III-5) és un test d'estadística circular que s'ha utilitzat per calcular la distribució temporal de les fases dels ritmes individuals respecte al cicle de LD.

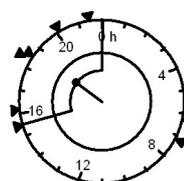


Figura III-5. Test de Rayleigh.

Amb aquest test s'obté un vector r que té l'origen al centre d'una circumferència de radi 1 on estan distribuïdes les fases estimades dels ritmes. La direcció i la longitud del vector es calcula com la mitjana vectorial dels vectors unitaris associats a les fases. Així la llargada del vector (entre 0 i 1) és proporcional al grau d'homogeneïtat (agrupament) de les fases. Valors baixos del vector indiquen una major dispersió de les fases. Si una fase predomina de forma estadísticament significativa es verifica comparant el mòdul del vector mitjà respecte

a un valor tabulat, representat en la figura com el cercle interior (Díez-Noguera, 2006).

7.2. Software d'anàlisi estadística i de ritmes

L'anàlisi estadística es va fer mitjançant el programa SPSS®.

Per analitzar les dades es va utilitzar un programa especialment dissenyat per a Cronobiologia: "El Temps[©]" (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999, <http://www.el-temps.com>).

