



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TREBALL DE FI DE GRAU**

# **ÍNDIX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR A L'HIPOCAMP DE RATA ADULTA AL LLARG DEL RITME CIRCADIÀ: DIFERÈNCIES ENTRE EL PERÍODE DE LLUM I D'OBSCURITAT**

**Laura Gálvez Melero**

**Grau de Bioquímica**

**Facultat de Ciències**

**Any acadèmic 2020-2021**

# ÍNDEX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR A L'HIPOCAMP DE RATA ADULTA AL LLARG DEL RITME CIRCADIÀ: DIFERÈNCIES ENTRE EL PERÍODE DE LLUM I D'OBSCURITAT

**Laura Gálvez Melero**

**Treball de Fi de Grau**

**Facultat de Ciències**

**Universitat de les Illes Balears**

**Any acadèmic 2020-2021**

Paraules clau del treball:

neurogènesi, cicle circadià, rosegadors, nit subjectiva

*Nom del tutor / la tutora del treball: M. Julia García-Fuster*

*Nom del tutor / la tutora (si escau)*

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Resum

El sistema circadià permet la coordinació de les funcions vitals de l'organisme en relació amb l'entorn i es basa en l'expressió d'una sèrie de gens que comporten un rellotge molecular, permetent que les cèl·lules puguin actuar de manera independent. Aquests gens són expressats a regions del cervell com ara l'hipocamp, regulant les seves funcions principals: l'aprenentatge i la memòria. Estudis previs han comprovat que aquestes funcions es troben íntimament relacionades amb la neurogènesi adulta, que consisteix en la generació de noves neurones a partir de cèl·lules progenitores. En aquest treball s'ha estudiat la regulació circadiana de la neurogènesi hipocampal en rates mascle adultes Sprague-Dawley, les quals han estat sacrificades en unes hores determinades, que corresponen a la fase de llum (8 h-20 h) o a la fase d'obscuritat (20 h-8 h). A partir d'una immunohistoquímica basada en l'ús del marcador endogen Ki-67, s'ha observat que la proliferació cel·lular és significativament superior durant la fase de foscor. Així doncs, aquest procés és major durant la nit subjectiva, que correspon al període actiu de les rates adultes. Aquests resultats, juntament amb altres estudis realitzats en models animals *knock-out* pels gens del rellotge molecular i sobre alguns factors reguladors de la neurogènesi, han permès obrir l'horitzó a l'estudi d'aspectes relacionats amb l'aprenentatge i la memòria, a més de conèixer de manera més profunda algunes malalties tant importants en l'actualitat com l'Alzheimer.

## Abstract

The circadian system allows the coordination of the organism's vital functions in relation to the environment. This system is based on the expression of a series of genes that involve a molecular clock, allowing cells to act independently. These genes are expressed in some regions of the brain such as hippocampus, regulating their main functions: learning and memory. Previous studies have shown that these functions are closely related with adult neurogenesis, which consists of the generation of new neurons from progenitor cells. In this report, the circadian regulation of hippocampal neurogenesis in adult male Sprague-Dawley rats has been studied. Rats were sacrificed within a given time, corresponding to the light phase (8 h–20 h) or the dark phase (20 h-8 h). Via the realization of an immunohistochemistry based on the use of the Ki-67 endogen marker, cellular proliferation was observed to be significantly higher during the dark phase. Thus, this process is greater during the subjective night, corresponding to the active period of adult rats. These results, along with other studies conducted on *knock-out* animal models for molecular clock genes and some regulatory factors of neurogenesis, have allowed the opening of new horizons in the study of learning and memory-related aspects, as well as increasing the knowledge about some important neural diseases such as Alzheimer.

# Índex

<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>5</b>
<hr/>	
<b>SISTEMA CIRCADIÀ</b>	<b>5</b>
<b>ORGANITZACIÓ DEL SISTEMA CIRCADIÀ</b>	<b>6</b>
<b>PAPER DE L'HIPOCAMP AL SISTEMA CIRCADIÀ</b>	<b>8</b>
<b>NEUROGÈNESI HIPOCAMPAL ADULTA</b>	<b>8</b>
<b>ETAPES I PROGRESSIÓ CEL·LULAR</b>	<b>9</b>
<b>MARCADOR ENDOGEN: KI-67</b>	<b>11</b>
<b>FACTORS DE REGULACIÓ</b>	<b>12</b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>13</b>
<hr/>	
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>14</b>
<hr/>	
<b>ANIMALS</b>	<b>14</b>
<b>DISSENY EXPERIMENTAL</b>	<b>14</b>
<b>EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES</b>	<b>15</b>
<b>PREPARACIÓ DE LES MOSTRES</b>	<b>15</b>
<b>IMMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>16</b>
<b>COMPTATGE CEL·LULAR</b>	<b>18</b>
<b>ANÀLISI DE DADES</b>	<b>18</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>19</b>
<hr/>	
<b>COMPARACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR ENTRE LES DIFERENTS HORES DEL DIA</b>	<b>19</b>
<b>COMPARACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR ENTRE LA FASE DE LLUM I LA D'OBSCURITAT</b>	<b>21</b>
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>22</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>26</b>
<hr/>	
<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>27</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>27</b>
<hr/>	

# Introducció

## Sistema circadià

El sistema circadià és el conjunt de mecanismes que s'encarrega de coordinar l'activitat i funcionalitat de les cèl·lules de l'organisme, per poder obtenir una adequada optimització de les funcions corporals<sup>1</sup>. Aquest sistema es basa en els anomenats ritmes circadians, els quals són canvis físics, mentals i conductuals que segueixen un cicle de 24 hores<sup>2</sup>. Per aquest motiu, es pot parlar també de cicle circadià.

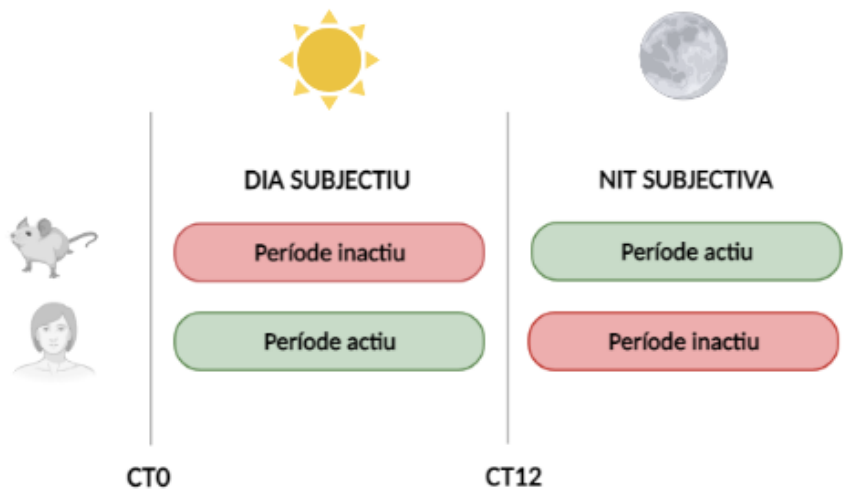
Els ritmes circadians responen als canvis circadians de l'exterior, com ara, la disponibilitat d'aliments o l'activitat dels depredadors<sup>3</sup>. Així doncs, es considera que el sistema circadià té com a paper principal l'organització de l'ordre temporal intern en relació amb l'entorn<sup>4</sup>. Per poder dur a terme aquest funció són necessaris uns dispositius de temps naturals, anomenats rellotges biològics<sup>3</sup>. Aquests rellotges regulen els ritmes en un període d'aproximadament 24 hores, de manera que s'anomenen rellotges circadians<sup>3</sup>.

L'estructura general del sistema circadià es basa en tres components principals<sup>4</sup>: les entrades o *inputs*, de les quals podem considerar com a la més important la llum; el marcapàs central, que s'encarrega de rebre els *inputs* i d'interpretar-los; i, finalment, les sortides o *outputs*, que permeten la transmissió de la senyal des del rellotge principal a totes les cèl·lules de l'organisme. En certes ocasions també es parla de *Zeitgeber*, concepte que fa referència a un temps que té la capacitat d'incorporar ritmes circadians<sup>5</sup>. El més important, de la mateixa manera que als *inputs*, és la llum<sup>5</sup>.

D'altra banda, també és important destacar els conceptes de dia i nit subjectius (**Figura 1**). Per delimitar aquests períodes es parla de temps circadià 0 (CT0) i temps circadià 12 (CT12). El dia subjectiu comprèn el període de temps des de CT0 a CT12<sup>5</sup>. El fet de que un animal sigui actiu durant la nit o durant el dia tant sols canvia en quin període de temps és actiu, no la nomenclatura d'aquesta. Així doncs, per aquelles espècies diürnes (com els humans), l'inici de l'activitat és CT0, mentre que per aquelles espècies nocturnes (p. ex. els rosegadors emprats en aquest estudi), el començament de l'activitat és CT12<sup>5</sup> (**Figura 1**). Aquests conceptes també es poden relacionar amb el de temps *Zeitgeber* (ZT). A n'aquest cas el sistema és el mateix, però es parla, concretament, de fase de llum, iniciada per ZT0, i de fase obscura, iniciada per ZT12<sup>5</sup>.

**Figura 1**

*Conceptes de dia i nit subjectius*



**NOTA.** Representació esquemàtica dels períodes actius i inactius dels rosegadors i dels humans, en relació amb el dia i nit subjectius. CT0 i CT12 indiquen l'inici del dia subjectiu i de la nit subjectiva, respectivament. **Adaptat de 10. Creat amb BioRender.**

### **Organització del sistema circadià**

El nucli supraquismàtic es considera el marcapàs central del sistema circadià de l'organisme<sup>3,4,6,7</sup>. Aquest nucli està format per un conjunt de neurones aparellades localitzades a la zona anteroventral de l'hipotàlem, per sobre del quiasma òptic<sup>3</sup>, i rep informació de, per exemple, la retina, encarregada de detectar la llum<sup>3</sup>.

El nucli supraquismàtic genera oscil·lacions de forma autònoma, a partir de les quals sincronitza tota la resta de rellotges de l'organisme, situats tant a nivell central, és a dir al propi cervell, com a nivell perifèric<sup>4,8</sup>. Aquesta interacció es troba regulada, principalment, per la secreció de melatonina per part de la glàndula pineal<sup>4,8</sup>. Concretament, aquesta hormona es secreta durant la nit subjectiva, de manera que el seu mínim es troba al període diürn<sup>4</sup>.

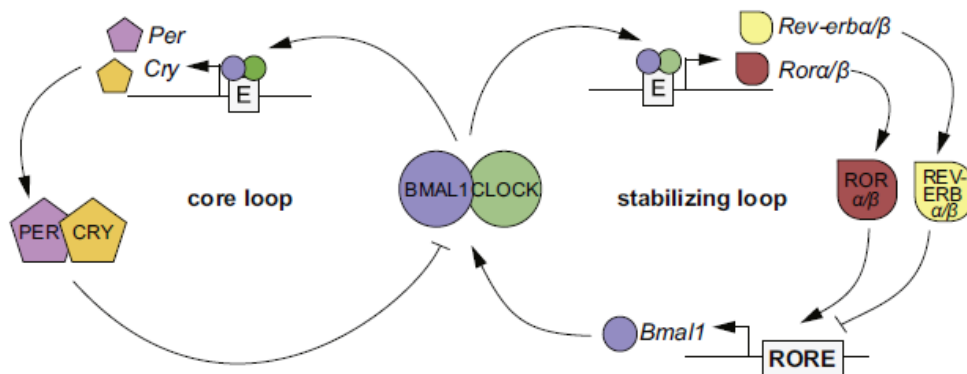
Cada cèl·lula del nucli supraquismàtic, i també la dels rellotges centrals i perifèrics, és capaç d'actuar com un oscil·lador individual, a través dels bucles de retroalimentació transcripcionals i traduccionals autoregulats pels anomenats gens rellotge<sup>3,9,10</sup>, que constitueixen l'anomenat rellotge molecular<sup>3</sup>. Aquests bucles, al controlar els ritmes circadians, es considera que triguen 24 hores en completar-se<sup>3</sup>.

En els vertebrats, aquest rellotge molecular es troba dividit en el bucle central i en el bucle d'estabilització, que estan connectats a través d'un heterodímer format per BMAL1 i CLOCK. Aquest heterodímer, al bucle central, s'uneix a les caixes E (*E-box*), que són considerades els elements potenciadors de la transcripció dels seus gens diana. Entre aquests gens diana podem destacar *Per* (*Period*) i *Cry* (*Cryptochromes*). Quan la seva transcripció és activada, aquests dos elements formen un heterodímer, que es transloca al nucli i inhibeix la transcripció de *Bmal1* i *Clock*<sup>3,9,10</sup> (**Figura 2**).

Respecte el bucle d'estabilització, podem destacar les proteïnes REV-ERB $\alpha/\beta$  i ROR $\alpha/\beta$ , transcripció de les quals és promoguda per l'heterodímer BMAL1:CLOCK. Aquestes proteïnes són, concretament, receptors orfes nuclears, que competeixen per la unió a l'element RORE, responsable de la transcripció de BMAL1. ROR $\alpha/\beta$  promou la transcripció del gen *Bmal1*, mentre que REV-ERB $\alpha/\beta$  la inhibeix<sup>3,9,10</sup> (**Figura 2**).

**Figura 2**

*Rellotge molecular de les cèl·lules*



**NOTA.** Representació esquemàtica dels dos bucles principals que dirigeixen el rellotge molecular a les cèl·lules (bucle central i bucle d'estabilització), juntament amb les proteïnes i els gens més representatius.

**Font 3.**

Cal tenir en compte que els gens rellotge també mostren una expressió circadiana amb una periodicitat propera a les 24 hores<sup>11</sup>. Concretament, s'ha comprovat que el pic màxim d'expressió de *Bmal1* té lloc a mitat de la nit, mentre que el dels missatgers de les proteïnes PER i CRY ocorre al mig dia<sup>11</sup>. Això és degut a què si l'expressió de *Bmal1* té lloc durant la nit subjectiva, significa que l'heterodímer BMAL1:CLOCK actua durant el dia sobre els seus gens diana<sup>11</sup>.

## Paper de l'hipocamp al sistema circadià

L'hipocamp, que és la regió d'estudi d'aquest treball, es considera un oscil·lador circadià subordinat al nucli supraquismàtic, de manera que funcions com la síntesi de neurotransmissors o l'excitabilitat sinàptica es regulen de forma circadiana<sup>12</sup>. Així doncs, l'hipocamp forma part de les regions centrals connectades al nucli supraquismàtic. Per tant, les seves cèl·lules funcionen de manera individual i es troben regulades pel rellotge molecular comentat anteriorment. No obstant, s'ha pogut observar que alguns teixits de l'organisme poden actuar com un oscil·lador semi autònom, amb capacitat de generar oscil·lacions de manera independent al marcapàs central<sup>13</sup>. S'hipotetitzava que l'hipocamp podria ser una d'aquestes regions independents.

D'altra banda, alguns estudis han investigat l'expressió de proteïnes essencials del rellotge molecular i la seva relació amb les funcions principals de l'hipocamp: la memòria i l'aprenentatge<sup>14</sup>. En aquestes investigacions, s'ha observat que les proteïnes PER<sup>12</sup> i BMAL1<sup>15</sup> tenen un paper essencial en la regulació temporal de la funció hipocampal. Fins i tot, s'ha observat una transcripció nocturna en ratolins del gen *Cry1*, suportant la hipòtesi de què es tracta d'un oscil·lador independent<sup>16</sup>.

En definitiva, amb l'observació de que l'hipocamp pot actuar com un oscil·lador subordinat o semi autònom expressant els gens essencials del rellotge molecular i la relació que suposa això amb les seves funcions principals (aprenentatge i memòria), a n'aquest treball es pretén estudiar la regulació circadiana de les primeres etapes de la neurogènesi hipocampal adulta, un procés relacionat estretament amb la funció hipocampal.

## Neurogènesi hipocampal adulta

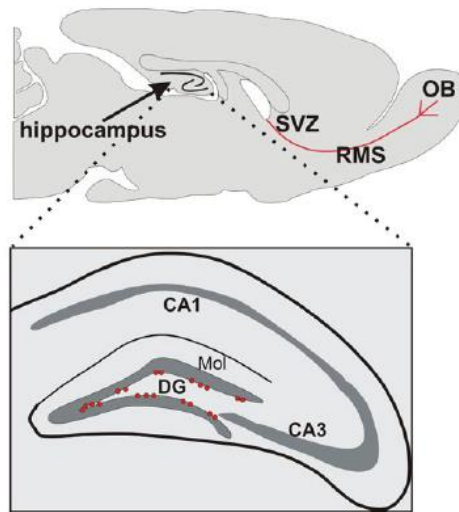
La neurogènesi és un procés que genera noves neurones a partir de precursors cel·lulars, també anomenats cèl·lules mare neuronals<sup>3</sup>. Al principi, es pensava que aquest procés es limitava a l'embriogènesi, de manera que molts d'autors varen establir que un cop acabat el desenvolupament no es produïen noves neurones<sup>17</sup>. No obstant, actualment es pot parlar de neurogènesi adulta, la qual consisteix en la generació de noves neurones a partir de les cèl·lules mare del cervell de mamífers (p. ex. humans i rosegadors) durant tota la vida<sup>3</sup>. A més, cal tenir en compte que no tant sols es poden modificar el nombre de neurones dels circuits neuronals preexistents, sinó que també es poden modificar les interaccions sinàptiques, a través de la plasticitat neuronal<sup>17</sup>.

La neurogènesi a l'etapa adulta ocorre principalment en dues zones específiques del cervell anterior (**Figura 3**): la zona subventricular dels ventricles laterals i la zona subgranular situada al gir dentat de l'hipocamp<sup>3</sup>. A n'aquest treball ens centrarem en la neurogènesi a la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp de rata adulta.



### Figura 3

#### Representació de l'hipocamp



**NOTA.** Il·lustració de l'hipocamp, destacant el gir dentat (DG) i la zona subventricular (SVZ). També s'indiquen el bulb olfatori (OB), el corrent migratori rostral (RMS) i les àrees CA1 i CA3 de l'hipocamp.

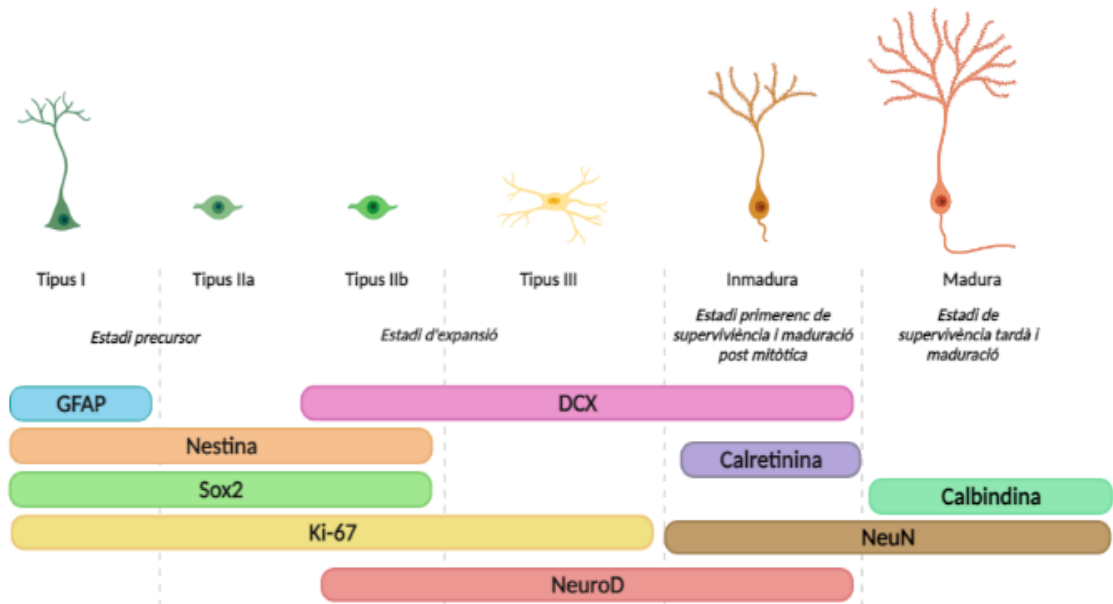
**Font 17.**

#### Etapes i progressió cel·lular

El procés de neurogènesi és dinàmic i es pot dividir en distints estadis: estadi precursor, estadi d'expansió, estadis primerenc i tardà de supervivència, i estadi de maduració post-mitòtic<sup>18</sup> (**Figura 4**). Aquestes etapes es caracteritzen per uns fenotips cel·lulars concrets i per una expressió específica de marcadors cel·lulars<sup>18</sup>. Als dos primers estadis predominen les cèl·lules de tipus I, les de tipus IIa i IIb, i les de tipus III<sup>18</sup>. Les de tipus I es consideren les precursors primerenques residents i tenen forma triangular<sup>17</sup>. Són les conegudes com cèl·lules mare<sup>17</sup> i normalment tenen un fenotip glial<sup>18,19</sup>. A continuació, es procedeix als fenotips IIa i IIb, ambdós fenotips considerats cèl·lules de proliferació ràpida<sup>17</sup>. Es caracteritzen per un cos cel·lular petit i un nucli amb forma irregular<sup>17</sup>. Les cèl·lules de tipus III, per la seva banda, es consideren neuroblasts<sup>18</sup> i, juntament amb les de tipus II, s'anomenen progenitors proliferatius<sup>19</sup>. Després d'aquests dos estadis i superant l'estadi primerenc de supervivència, les cèl·lules surten del cicle cel·lular<sup>18</sup>, passant-se a anomenar cèl·lules post-mitòtiques<sup>17</sup>. Aquestes cèl·lules són les cèl·lules granulars immadures i les madures<sup>17-19</sup>. Es caracteritzen per orientar-se de manera adequada en direcció a l'àrea CA3, per així integrar-se a la xarxa de l'hipocamp i establir connexions<sup>17,18</sup>. Així doncs, els fenotips immadurs i madurs són els representants dels estadis de supervivència primerenc i tardà, respectivament, a més dels de l'etapa de maduració<sup>18</sup>.

**Figura 4**

*Etapes de progressió cel·lular durant la neurogènesi hipocampal*



**NOTA.** Representació esquemàtica de les diferents etapes de progressió cel·lular que tenen lloc durant la neurogènesi al gir dentat de l'hipocamp. També es representen els tipus cel·lulars que corresponen a les diferents etapes i els marcadors moleculars més representatius. **Adaptat de fonts 17, 18 i 19. Creat amb BioRender.**

Juntament amb aquestes etapes i els tipus cel·lulars, cal tenir present l'expressió específica dels marcadors moleculars per part de les diferents cèl·lules. Les cèl·lules de tipus I es caracteritzen per l'expressió d'algunes proteïnes com la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP), el filament intermediari anomenat Nestina i el gen 2 de la caixa HMG relacionada amb SRY (Sox2)<sup>17</sup>. Aquests dos darrers marcadors (Nestina i Sox2) també es troben a les cèl·lules de tipus IIa i IIb<sup>17</sup>. Els fenotips IIa i IIb es diferencien perquè la de tipus IIa és negativa per DCX i la de tipus IIb positiva<sup>17</sup>. El marcador DCX també és expressat per les de tipus III. És important destacar la proteïna Ki-67 (expressat pels fenotips I, II i III), el qual és el marcador endogen emprat a n'aquest treball per marcar cèl·lules en proliferació. També es pot parlar del marcador NeuroD, que s'empra per a la identificació de les cèl·lules primerenques del llinatge neuronal, de manera que es sol emprar per identificar aquelles neurones mitòticament actives. Així doncs, s'expressa tant a les cèl·lules de tipus II com a les de tipus III<sup>17</sup>. Respecte les cèl·lules granulars immadures, aquestes es caracteritzen per ser positives per la proteïna d'unió a calci anomenada calretinina<sup>17</sup>. També expressen NeuN, juntament a les cèl·lules granulars madures, el qual és un marcador post-mitòtic<sup>17</sup>. Finalment, la calbindina es considera el marcador principal de les cèl·lules madures neuronals<sup>17</sup>.

Així doncs, com que l'expressió dels diferents marcadors és específica per a cada etapa de la neurogènesi en l'adult, l'estudi d'aquests marcadors permet seguir el curs, de manera precisa i detallada, de les cèl·lules precursors del gir dentat<sup>17</sup>. Alguns marcadors s'empren com a marcadors de proliferació cel·lular, com ara Ki-67 i Sox2<sup>19</sup>. Altres, com ara DCX i NeuroD, s'empren com a marcadors de diferenciació cel·lular<sup>19</sup>.

Respecte aquests marcadors, també és important tenir present el seu temps d'expressió. Alguns exemples a destacar serien: Ki-67, que s'expressa durant el cicle cel·lular (24-25 hores)<sup>19,20</sup>; NeuroD, que s'expressa entre els dies 2-6 post-naixement<sup>19</sup> i la seva expressió dura aproximadament fins als 14 dies<sup>21</sup>; i NeuN, que és expressat per les neurones immadures i madures, de manera que pot ser detectat a partir de les 2-4 setmanes post-naixement<sup>20</sup>.

### **Marcador endogen Ki-67**

Ki-67 és el marcador de proliferació endogen per excel·lència. Com s'ha comentat, és una proteïna nuclear expressada en totes les fases del cicle cel·lular, excepte a la fase de repòs<sup>17,22</sup> i durant els processos de reparació de l'ADN<sup>17</sup>. S'ha pogut comprovar que la seva expressió es produeix durant la mitosi en tots els mamífers, des dels rosegadors fins als humans<sup>22</sup>.

Fins ara, un dels mètodes més emprats per a l'estudi de la proliferació cel·lular era l'administració intraperitoneal del 5'-bromo-2-desoxiuridina (BrdU). Aquest marcador exogen ha estat, per tant, un dels més utilitzats per a l'estudi d'aquest procés<sup>22</sup>. No obstant, a causa de les seves limitacions i els seus inconvenients s'han cercat alternatives, majoritàriament basades en l'ús de marcadors endògens i, com s'ha comentat, s'ha optat per l'ús de Ki-67<sup>22</sup>.

Si es duu a terme una comparació entre els dos marcadors, es poden observar els avantatges que suposa l'ús de Ki-67 enfront al de BrdU. En primer lloc, el BrdU, a l'haver-se d'administrar exògenament, pot tenir efectes tòxics sobre la cèl·lula, mentre que Ki-67 no té cap efecte negatiu sobre aquestes<sup>22</sup>. La presència d'alguns factors com la barrera hematoencefàlica poden reduir l'accessibilitat del marcador exogen a cèl·lules del cervell<sup>22</sup>. Per aquest motiu, a partir d'una comparació quantitativa de cèl·lules positives per ambdós marcadors, es va poder observar un nombre major de cèl·lules marcades amb Ki-67<sup>22</sup>. Aquest fet també pot ser degut a que el marcador exogen tan sols es pot incorporar a l'ADN quan la cèl·lula es troba en fase S, mentre que, com s'ha comentat anteriorment, el Ki-67 s'expressa durant quasi totes les fases del cicle cel·lular<sup>22</sup>. A més, un dels avantatges principals que suposa l'ús del marcador endogen és que no és necessària la manipulació prèvia de l'animal, fet que evita l'estrès que pot suposar l'administració intraperitoneal de BrdU<sup>23</sup>.

## *Factors de regulació*

La neurogènesi al gir dentat de l'adult es produeix de manera constitutiva al llarg de la vida post natal i la seva taxa es modifica a partir de diverses condicions fisiològiques i fisiopatològiques<sup>17</sup>. Podem parlar de factors externs positius o negatius, que promouran o inhibiran, respectivament, la neurogènesi hipocampal adulta.

Un dels principals factors positius estudiats ha estat l'activitat física<sup>24-26</sup>. S'hipotetitzava que l'exercici promouria el procés de neurogènesi a l'hipocamp a través de l'estimulació del factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF)<sup>25</sup>. Aquesta proteïna s'expressa rítmicament a l'hipocamp, suggerint l'existència d'una regulació circadiana sobre la seva expressió<sup>6</sup>. De la mateixa manera, el subministrament d'antidepressius o l'electroxoc, tractaments emprats per als trastorns depressius, també estimulen el procés<sup>25</sup>.

D'altra banda, com a exemples de possibles factors negatius que poden reduir el procés neurogènic podríem xerrar de l'estrès crònic<sup>1</sup> o de l'exposició a drogues d'abús<sup>27</sup>, entre d'altres. A nivell fisiològic, per exemple, la neurogènesi adulta va disminuint amb l'edat<sup>4</sup>, i a nivell patològic s'han observat disminucions associades amb trastorns depressius<sup>27</sup>, amb la patologia tipus Alzheimer<sup>28</sup> i amb dany cerebral<sup>29</sup>, entre d'altres.

També s'ha evidenciat la privació de la son com un dels principals factors que provoquen una disminució de la proliferació cel·lular a l'hipocamp en rates adultes<sup>6,27</sup>. Es defensa que podria afectar als nivells de la proteïna BDNF, comentada anteriorment<sup>6</sup>. De fet, s'ha comprovat que substàncies psicoactives com la cafeïna, a més d'afectar al cicle normal son-vigília, també disminueixen la neurogènesi<sup>27</sup>. Per tant, se podria suggerir que aquest factor negatiu afecta a la neurogènesi hipocampal adulta pel seu clar efecte sobre el cicle circadià<sup>1,6,9</sup>.

## Objectius

L'objectiu principal d'aquest Treball de Fi de Grau (TFG) és estudiar l'índex de proliferació cel·lular en l'hipocamp de rata adulta al llarg del ritme circadià per poder avaluar si existeixen diferències en la seva regulació entre el període de llum i de foscor. Per aconseguir aquest objectiu, el TFG es centra en els següents objectius concrets:

- 1) La revisió de la literatura científica sobre el tema proposat.
- 2) L'aprenentatge de la metodologia necessària per avaluar i quantificar les cèl·lules de nova proliferació per tècniques immunohistoquímiques (marcador endogen Ki-67) a l'hipocamp de rata al llarg del ritme circadià.
- 3) La quantificació dels resultats obtinguts, així com la seva avaluació estadística.
- 4) La preparació de la memòria i exposició oral del TFG.

## Materials i mètodes

### Animals

Per aquest treball es varen emprar 42 rates mascle Sprague-Dawley adultes, de la colònia pròpia del grup d'investigació criada a l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears. Aquests animals tenien un accés lliure a menjar (dieta estàndard i aigua) i es trobaven en un ambient controlat (22 °C, 70% humitat). A més, esteien sotmeses a un cicle de 12 hores de llum/12 hores d'obscuritat (les llums s'encenien a les 8 h). En tot moment, es va intentar minimitzar al màxim el nombre de rates i el seu sofriment.

### Disseny experimental

Les 42 rates es varen dividir en 8 grups experimentals al llarg del cicle circadià (n=5-6 animals per punt experimental, **Taula 1**) i englobats en les dues fases del dia: fase fosca o obscura (n= 22) i fase de llum (n= 20). Aquestes rates es trobaven a les mateixes condicions controlades de l'estabulari comentades a l'apartat anterior. Varen ser sacrificades a les hores corresponents al grup del qual formaven part (**Taula 1**).

#### **Taula 1**

##### *Grups d'experimentació*

<b>Rates adultes de fase obscura</b>	<b>Rates adultes de fase de llum</b>
22 h: n=5	10 h: n=5
1 h: n=6	13 h: n=5
4 h: n=5	16 h: n=5
7 h: n=6	19 h: n=5
<b>n= 22</b>	<b>n= 20</b>

**NOTA.** Esquematzació dels dos grans grups (fase de llum i fase d'obscuritat), amb 4 grups per fase, en que es varen dividir les rates de l'experiment, amb les hores (h) corresponents i el nombre de rates per a cada una d'elles.

## Extracció de les mostres

Per dur a terme l'extracció de les mostres es va procedir, en primer lloc, a sacrificar els animals mitjançant la decapitació al temps indicat al disseny experimental. Posteriorment, es varen extreure els seus cervells i es varen tallar per la meitat sagitalment, aconseguint l'hemisferi esquerre i l'hemisferi dret per separat. En aquest treball, per dur a terme la immunohistoquímica, va ser necessari l'ús de l'hemisferi esquerre. Aquesta mostra es va congelar primer en isopentà a -20/-30 °C, i després es va conservar a -80 °C, fins que va ser tallada amb el criòstat (protocol extret de la font 33). L'hemisferi dret es pot emprar per altres tipus d'experiments que no corresponen a aquest treball, com seria l'anàlisi de marcadors proteics per la tècnica Western Blot.

## Preparació de les mostres

Per a cada animal es disposava d'una mostra de cervell recollida anteriorment a la qual es varen realitzar talls histològics de 30 µm amb el criostat. Els talls es varen recollir en 8 sèries (A, B, C, D, E, F, G, H), de manera que es va col·locar 1 de cada 8 talls a cada una de les sèries. Per exemple, per la sèrie A, el primer tall es va situar a la part inferior dreta del portaobjectes (1 de A1, **Figura 5**). El següent tall es va situar a la part superior dreta, el qual correspon, com s'ha comentat, al novè tall. Així doncs, els talls es van anar situant de manera successiva en forma de ziga-zaga per completar els 8 de cada portaobjectes (**Figura 5**).

**Figura 5**

*Portaobjectes de la preparació de les mostres*

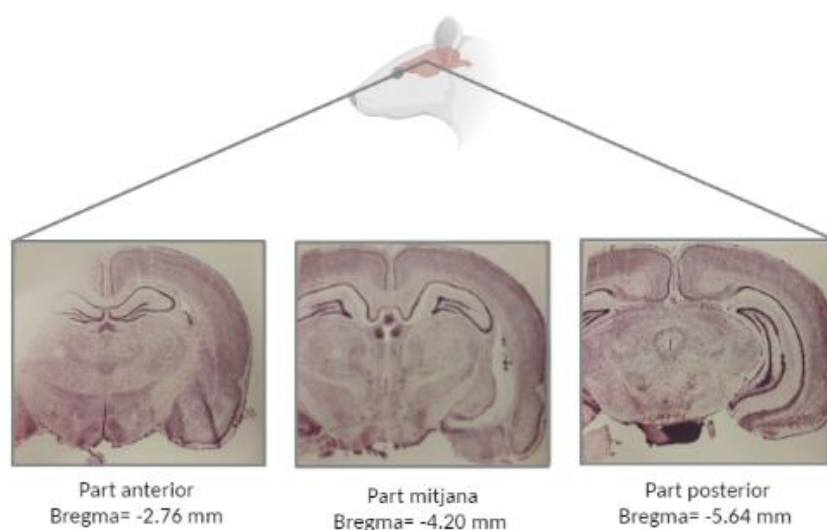
Rata #	57	41	25	9	+
A1	49	33	17	1	+
Rata #	121	105	89	73	+
A2	113	97	81	65	+
Rata #	185	169	153	137	+
A3	177	161	145	129	+

**NOTA.** Representació dels tres portaobjectes que corresponen a la sèrie A (A1, A2 i A3). S'indica també l'ordre dels talls histològics.

A més, per a cada sèrie, es completen 3 portaobjectes. Per exemple, per a la sèrie A, parlariem de A1, A2 i A3. Els nombres "1", "2" i "3" indiquen la part anterior, mitjana i posterior, respectivament, de la regió hipocampal del cervell. Així doncs, al final s'obtenen un total de 24 talls per a cada 3 portaobjectes. La disposició d'aquests talls es duu a terme amb la intenció d'obtenir una representació de tot el gir dentat (-1,72 a -6,80 mm del Bregma) per a cada mostra (Figura 6) (protocol extret de la font 33).

## Figura 6

*Parts anterior, mitjana i posterior del cervell*



**NOTA.** Imatges representatives de la part anterior, mitjana i posterior del cervell i el seu respectiu Bregma. Adaptat de la font 34. Creat amb BioRender.

## Immunohistoquímica

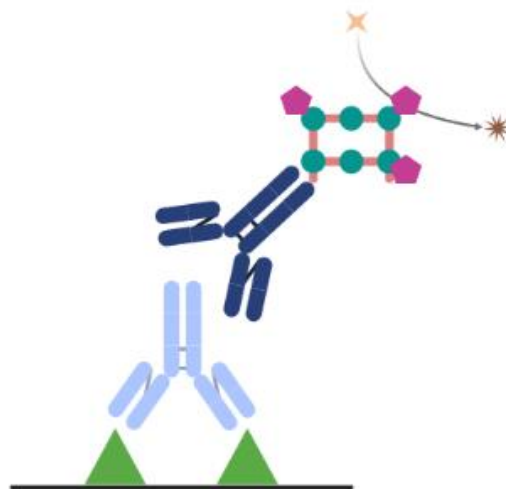
Una sèrie amb 3 portaobjectes obtinguts amb la preparació de les mostres es va sotmetre a la tècnica d'immunohistoquímica per poder diferenciar les cèl·lules que expressaven el marcador endogen Ki-67 i, per tant, que es trobaven en proliferació cel·lular. En primer lloc, els portaobjectes es varen fixar en paraformaldehid al 4% i es va dur a terme l'exposició de l'antigen emprant citrat sòdic al 10% (pH 6,0, 90 °C, 1 h). Posteriorment, les mostres es varen incubar durant 30 minuts amb una solució de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% (60 mL stock al 3% + 540 mL de tampó salí de fosfats, PBS) per poder inhibir la peroxidasa endògena. Després de rentats consecutius amb PBS es va emprar un bolígraf segellador impermeable (el *PAP PEN*) per poder delimitar, acuradament, una àrea rectangular al voltant de les mostres del portaobjectes, i així evitar la sortida del líquid. Seguidament, es varen incubar les mostres durant 1 h amb 500 µL de sèrum d'albúmina bovina (BSA), per poder dur a terme el bloqueig. Després, es va descartar el diluent



i les mostres es varen incubar durant tot el vespre amb l'anticòs policlonal de Ki-67 (1:400000, donat per la Dra. Huda Akil, Universitat de Michigan, E.U.A.). Aquesta incubació va venir seguida d'una segona incubació amb l'anticòs secundari anti-conill (1:1000). Aquesta unió va ser detectada gràcies al complex Avidina/Biotina (60 µl d'Avidina + 60 µl de Biotina en 60 ml de BSA) i la preparació del cromogen DAB (3,3'-di-aminobenzidina, 750 mg DAB + 3 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en 600 ml d'acetat sòdic). Concretament el que s'aconsegueix és que el DAB, al ser un substrat de la peroxidasa unida a l'anticòs secundari, es transformi en un producte que proporcioni una senyal detectable de color marró (**Figura 7**). Així doncs, les cèl·lules que expressin Ki-67 quedaran tenyides de color marró i podran ser comptades. A més, el complex Avidina/Biotina permet una amplificació de la senyal. Per poder diferenciar les cèl·lules en proliferació la resta, es va dur a terme una darrera tinció amb blau-violeta de cresil, que tenyeix els nuclis de les cèl·lules. Posteriorment, es va realitzar una deshidratació mitjançant una bateria d'alcohols de graduacions ascendents i es va submergir en xilè. Al final, es varen recobrir tots els portaobjectes amb uns cobre-objectes i una gota d'adhesiu (protocol extret de la font 33).

### Figura 7

*Reconeixement de l'antigen Ki-67*



**NOTA.** Representació esquemàtica del reconeixement de l'antigen (triangle verd) per part de l'anticòs primari (anticòs blau fluix). Aquest anticòs és reconegut alhora per l'anticòs secundari (anticòs blau fort), unit al complex Avidina/Biotina (rectangle format per línies roses i cercles color turquesa) amb la peroxidasa (pentàgons roses). Aquest enzim transforma el DAB (estrella marró fluix) en un producte que dona senyal de color marró (estrella marró fort). **Adaptat de la font 35. Creat amb Biorender.**

## Comptatge de les mostres

A partir de la immunohistoquímica, com s'ha comentat, es va aconseguir diferenciar les cèl·lules positives pel marcador endogen Ki-67 (color marronenc) de la resta (color blau-violeta). Pel comptatge es va emprar un microscopi òptic Leica DMR (augment 63x). Les cèl·lules es varen comptar seguint l'ordre de les seccions establert a la preparació de les mostres, de manera que es va seguir un ordre en forma de ziga-zaga (**Figura 8**).

**Figura 8**

*Ordre del comptatge de les mostres*

Rata #	57	41	25	9	+
A1	49	33	17	1	+

Rata #	8	6	4	2	+
A1	7	5	3	1	+

**NOTA.** Representació del portaobjectes A1 i del seu ordre de comptatge.

## Anàlisi de dades

L'anàlisi de dades d'aquest treball es va dur a terme amb el programa informàtic *GraphPad Prism*, Versió 8. A partir del comptatge cel·lular es va obtenir un nombre concret de cèl·lules per a cada rata. Per obtenir aquest nombre, es varen sumar les cèl·lules de cada portaobjectes (ex. A1, A2 i A3) i es varen multiplicar per 8, ja que, com s'ha comentat, per a cada rata es va quantificar 1 de les 8 sèries recollides. Es va calcular la mitjana i l'error estàndard per a cada grup experimental (hora de sacrifici) i també per a cada fase (fase d'obscuritat i fase de llum). A partir d'aquestes dades es varen realitzar els següents anàlisis estadístics:

- ANOVA d'una via per comparar el nombre de cèl·lules entre les diferents hores.
- Test *t* de Student de dues coes per variables independents per comparar el nombre de cèl·lules del grup de fosc i de llum.

Anteriorment a aquests tests es va comprovar que les dades seguien una distribució normal.

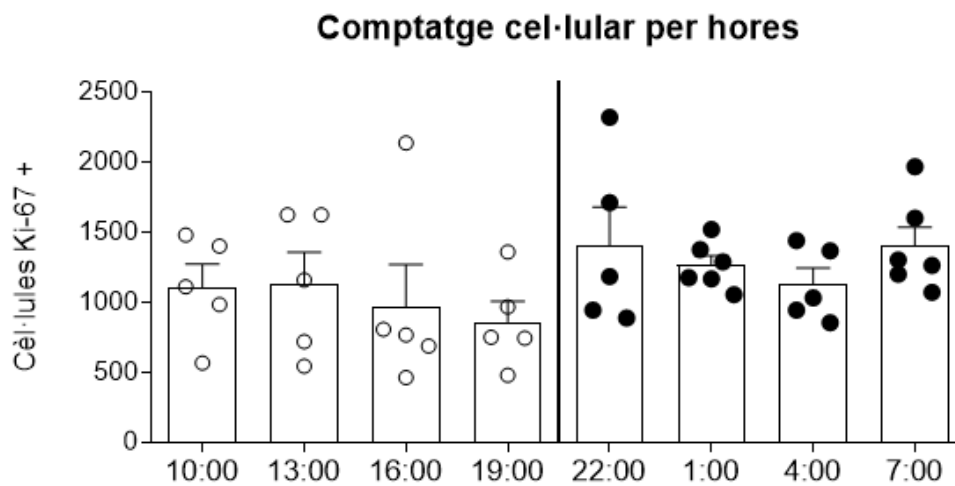
## RESULTATS

### *Comparació de la proliferació cel·lular entre les diferents hores del dia*

A partir del comptatge cel·lular realitzat amb el microscopi òptic es va estudiar la diferència en la proliferació cel·lular al gir dentat a les diferents hores del cicle circadià. Els resultats demostren que no s'observen diferències significatives en el nombre de cèl·lules quantificades entre grups experimentals (ANOVA,  $p=0,3956$ ) (Figures 9 i 10).

**Figura 9**

*Gràfica del comptatge cel·lular per hores*

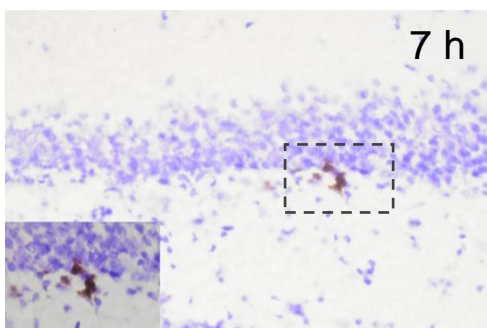
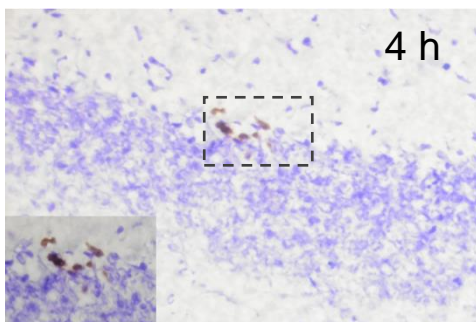
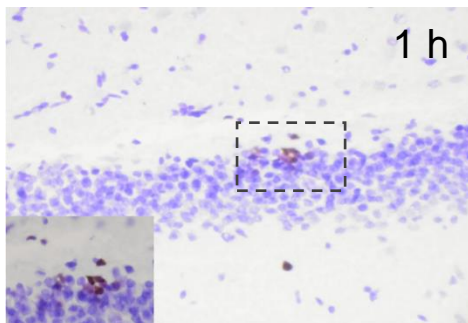
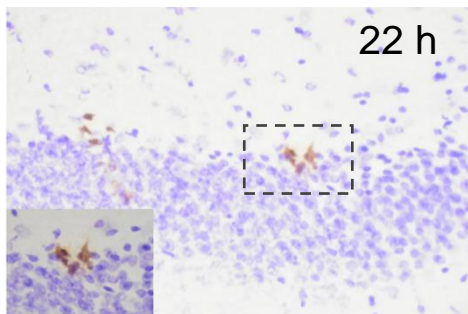


**NOTA.** Els requadres representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana del nombre de cèl·lules Ki-67 positives a cada una de les diferents hores d'estudi al llarg del cicle circadià. Els cercles representen els valors individuals de cada animal a cada punt experimental (cercles transparents: hores de llum; cercles negres: hores d'obscuritat).

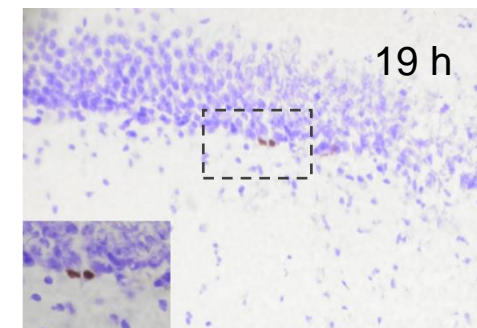
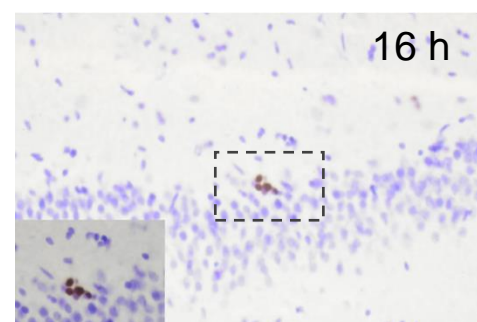
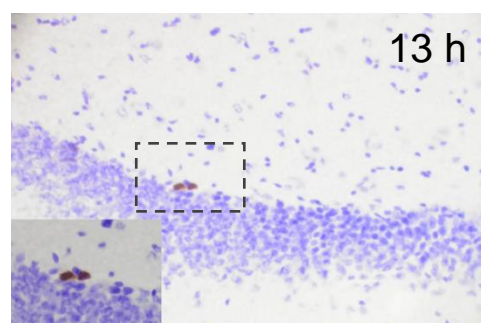
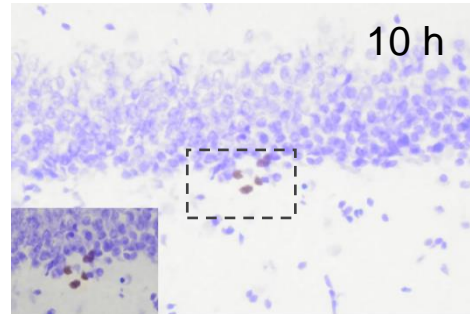
**Figura 10**

*Imatges representatives de la immunohistoquímica a cada punt experimental*

A)



B)



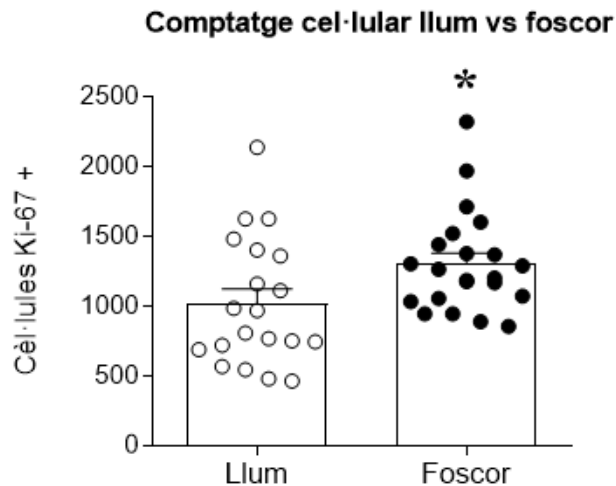
**NOTA.** Imatges representatives del marcatge cel·lular de Ki-67 a les diferents hores (A) fase d'obscuritat i (B) fase de llum. Les imatges més grans varen ser obtingudes amb el microscopi òptic Leica DMR amb l'augment 40x. Per poder visualitzar millor les cèl·lules marcades es va fer una altra fotografia amb l'augment 63x (imatges més petites dins els requadre).

### Comparació de la proliferació cel·lular entre la fase de llum i la d'obscuritat

Una vegada comparat el comptatge cel·lular entre les diferents hores, es va dur a terme l'anàlisi de la proliferació cel·lular en el gir dentat agrupant les rates en la fase de llum (grups de les 10, 13, 16 i 19 h) i en la fase d'obscuritat (grups de les 22, 1, 4 i 7 h). Es varen poder observar diferències significatives en la proliferació cel·lular entre les dues fases (*t*-test,  $t=2,257$ ,  $df=40$ ,  $p=0,0295$ ). A les mostres de la fase de fosc es va observar un major nombre de cèl·lules positives per Ki-67 ( $1304 \pm 76$  cèl·lules,  $n= 20$ ) en comparació amb les de la fase de llum ( $1019 \pm 102$  cèl·lules,  $n= 22$ ) (+285,  $*p=0,0295$ ; **Figura 11**).

**Figura 11**

Gràfica del comptatge cel·lular per fases



**NOTA.** Els requadres representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana del nombre de cèl·lules Ki-67 positives a cada una de les diferents fases d'estudi. Els cercles representen els valors individuals de cada animal a cada punt experimental (cercles transparents: hores de llum; cercles negres: hores d'obscuritat).

## Discussió

Observant els resultats d'aquest treball, es pot afirmar que l'índex de nova proliferació cel·lular (primers estadis de la neurogènesi hipocampal) és major durant la nit subjectiva en rates adultes. Aquests resultats s'han obtingut de manera significativa quan s'han comparat els dos grups experimentals (fase de foscor i fase de llum, **Figura 11**), encara que no s'han vist diferències en el nombre de cèl·lules proliferatives entre les diferents hores de l'experiment (**Figura 9**). Consultant les fotografies realitzades a partir de la immunohistoquímica, es pot comprovar que a les hores de foscor hi ha un major nombre de cèl·lules marcades amb Ki-67 (color marró) que a les de llum (**Figura 10**).

Aquests resultats s'ajusten a altres estudis anteriors basats en l'anàlisi de l'efecte del cicle circadià sobre les fases de la neurogènesi hipocampal adulta. Algunes d'aquestes investigacions han estudiat el procés en ratolins adults, uns models animals molt emprats també en aquest àmbit. Així doncs, es pot destacar, per exemple, l'estudi realitzat per Bouchard-Cannon i col·laboradors (2013), els quals varen revelar una major proliferació cel·lular durant la nit subjectiva a la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp de ratolins adults<sup>7</sup>. En aquest experiment es va emprar el marcador exogen BrdU, el qual, com es va comentar, és molt emprat en experiments de l'estudi de les fases de neurogènesi, encara que el seu ús presenta una sèrie de limitacions. En particular, varen observar aquesta major proliferació durant la nit subjectiva tant en aquells ratolins que seguien un cicle de 12 hores de llum i 12 hores d'obscuritat (cicle que es segueix a n'aquest treball), com els que es varen sotmetre a una foscor permanent de 2 dies<sup>7</sup>.

Un altre estudi que va permetre afirmar que la proliferació cel·lular a l'hipocamp de l'adult era major durant la nit subjectiva va ser el de Tamai i col·laboradors (2008). En aquest experiment varen emprar també ratolins adults, que varen ser sotmesos a un cicle de 12 hores de llum/12 hores d'obscuritat durant 2 setmanes. A l'igual que a n'aquest treball, varen ser sacrificats a una hora en concret i després, a través del marcatge per l'anticòs en front a la fosfo-histona H3, es va poder analitzar la proliferació cel·lular<sup>30</sup>. Aquest marcador s'expressa durant la fase final de G2 i a la fase M de la divisió cel·lular i s'empra habitualment per a la identificació de cèl·lules proliferants i mitòtiques a l'hipocamp<sup>17</sup>.

D'acord als investigadors de l'estudi comentat, la proliferació cel·lular és menor durant la fase de llum perquè és a n'aquest període del dia quan la progressió de les cèl·lules progenitores a la fase M es troba inhibida<sup>30</sup>. Aquest fet es pot relacionar amb la idea comentada anteriorment de que el pic màxim d'expressió de *Bmal1* té lloc durant la nit, de manera que el complex BMAL1:CLOCK actua damunt els seus gens diana durant el dia. El que s'ha hipotetitzat és que l'heterodímer CLOCK:BMAL1 activa la transcripció del gen *Wee1*, que codifica per una quinasa que bloqueja la progressió cel·lular a nivell de la fase M<sup>11</sup>.

Per tant, els resultats presentats en aquest treball validen dades prèvies que afirmen una major proliferació cel·lular hipocampal en ratolins adults<sup>7,30</sup> i amplien els resultats per a una altre espècie animal (rates).

A partir d'aquí, s'han emprat models animals, als quals se'ls hi ha provocat una arritmicitat inhibint l'expressió dels diferents gens rellotge comentats anteriorment. Així doncs, s'han emprat ratolins *knock-out* dels gens rellotge principals dels bucles de retroalimentació<sup>11</sup>. Els models animals més utilitzats per a la investigació de la relació entre el cicle circadià i el cicle cel·lular han estat els *knock-out* homozigots per *Bmal1*, *Per1*, *Cry1* i *Cry2*. S'ha estudiat tant l'efecte que té aquesta depleció sobre el cicle cel·lular, com la influència negativa sobre les funcions principals de l'hipocamp.

L'estudi comentat anteriorment de Bouchard-Cannon i col·laboradors (2013) va examinar els efectes de l'ablació dels gens *Bmal1* i *Per2* en ratolins adults. Es va observar que en els ratolins *Per2* *-/-* la ritmicitat de la proliferació va desaparèixer, mentre que als *Bmal1* *-/-* el nombre de cèl·lules proliferatives va augmentar al ZT0 i ZT12<sup>7</sup>. En ambdós casos, a més, el nombre de cèl·lules BrdU positives a tots els períodes va ser superior en comparació amb les dels ratolins control. A partir d'aquests resultats es va suggerir que el gen *Per2* permet l'entrada de les cèl·lules mare neuronals quiescents al cicle cel·lular, mentre que el gen *Bmal1* restringeix aquesta entrada i promou l'aparició d'un major nombre de cicles de divisió<sup>7</sup>. També es pot destacar l'estudi realitzat per Rakai i col·laboradors (2010). En aquest cas, no obstant, no es varen observar diferències proliferatives a les cèl·lules de la zona subventricular en ratolins adults *Bmal1* *-/-* als diferents períodes del dia. Ara bé, sí es va contemplar una menor apoptosi d'aquestes cèl·lules durant la fase obscura, suportant la idea de la major supervivència d'aquestes cèl·lules<sup>9</sup>.

La investigació de l'efecte de l'arritmicitat sobre la proliferació cel·lular no tant sols s'ha estudiat *in vivo*, com als estudis que s'han comentat anteriorment, sinó també *in vitro*, sent un exemple l'estudi realitzat per Malik i col·laboradors (2015). Així doncs, es varen examinar els efectes de la depleció dels gens *Bmal1*, *Cry1* i *Cry2* en cultius cel·lulars de neurones, també anomenats com a neuroesferes. Encara que es va observar que aquests gens no eren necessaris per a la formació de les cèl·lules *in vitro*, es va veure una disminució del creixement i del compromís neuronal, i un augment de l'apoptosi<sup>31</sup>. També es va observar que a n'aquelles cèl·lules que tenien una depleció dels gens *Cry1* i *Cry2*, la proliferació esteia significativament reduïda<sup>31</sup>. Respecte l'efecte sobre les funcions essencials de l'hipocamp, en ratolins *Cry1* *-/-* i *Cry2* *-/-* s'ha observat una memòria de reconeixement deficient i un augment de l'ansietat<sup>31</sup>. Alhora, als ratolins *Bmal1* *-/-* s'ha examinat una habilitat d'aprenentatge disminuït<sup>31</sup>. Fins i tot, en ratolins *Per1* *-/-* s'ha observat una reducció de la memòria espacial<sup>31</sup>.

Altres investigacions han evidenciat la relació entre el cicle circadià i la neurogènesi hipocampal adulta a través de l'estudi de l'efecte dels factors negatius i positius comentats anteriorment.

Com es va comentar, el principal factor negatiu estudiat ha estat la privació de la son. Dintre de tots els estudis realitzats es pot destacar el de Kochman i col·laboradors (2009). Els investigadors varen examinar l'administració de substàncies psicoactives a rates adultes Sprague-Dawley. Varen poder observar que l'administració d'aquestes drogues durant la fase de llum provocava una disminució de la proliferació cel·lular a l'hipocamp, a diferència de quan s'administraven a la fase obscura. Aquest resultat es va relacionar amb el fet de què l'administració a la fase de llum causava una privació de la son<sup>27</sup>. D'entre els factors positius, per la seva banda, el més estudiat ha estat l'exercici. Es pot destacar l'estudi de Nokia i col·laboradors (2016), on es va observar que la neurogènesi hipocampal era major en rates adultes Sprague-Dawley sotmeses a un exercici aeròbic (carrera de roda voluntària o carrera de resistència en cinta de córrer), en comparació amb els que no varen dur a terme aquesta activitat física<sup>24</sup>. Això és rellevant perquè l'augment a l'índex de proliferació cel·lular s'observa a la nit subjectiva, que és el moment d'activitat de les rates, de manera que es pot pensar que és aquesta mobilitat/exercici que afavoreix la generació de noves cèl·lules.

Analitzant tots aquests estudis i els resultats d'aquest treball al final ens podem plantejar quina és la importància real de conèixer la regulació circadiana que segueixen les diferents fases de la neurogènesi hipocampal adulta. Cal tenir present que la neurogènesi és un dels processos més importants que ocorren al nostre organisme, ja que permet la substitució de neurones disfuncionals per neurones noves<sup>1</sup>. El fet de que tingui lloc al gir dentat de l'hipocamp es relaciona directament amb l'adquisició de les seves funcions essencials, com serien l'aprenentatge i la memòria<sup>6</sup>. Així doncs, conèixer que durant el període actiu els rosegadors tenen una major proliferació cel·lular a l'hipocamp, permet saber que és el millor moment del dia per aprendre algunes funcions com ara la navegació del laberint<sup>6</sup>. D'altra banda, cal tenir en compte que la regulació d'aquest procés no tant sols es relaciona amb funcions fisiològiques, sinó que també es pot relacionar amb algunes patologies neurològiques i psicològiques<sup>32</sup>, com s'ha comentat anteriorment. Les dues principals malalties en què s'ha trobat una relació entre la neurogènesi hipocampal adulta i el sistema circadià han estat l'Alzheimer i el trastorn depressiu.

L'Alzheimer és una de les malalties amb més incògnites plantejades sobre els seus mecanismes moleculars bàsics<sup>28</sup>. No obstant, l'estudi de la interacció entre el cicle circadià i la neurogènesi ha permès aprofundir en les bases moleculars d'aquesta malaltia neurodegenerativa. Aquesta malaltia s'ha relacionat principalment amb les alteracions de la son, concretament en la interrupció i fragmentació d'aquest període del dia. És més, s'ha pogut observar que aquests canvis en la son tenen lloc en estadis primerencs de la malaltia, de manera que es pot emprar com a marcador per a una detecció precoç. Així doncs, canvis en el ritme circadià s'han relacionat directament amb el deteriorament cognitiu associat amb la patologia<sup>28</sup>. A més, un dels aspectes que també cal destacar és que les propietats circadianes de les cèl·lules neuronals ha permès conèixer quin és el millor moment del dia per a l'administració del tractament<sup>31</sup>. Es



podria dir, doncs, que durant el període actiu de l'animal aquest és més susceptible als efectes del fàrmac, ja que seria quan les noves cèl·lules es troben en proliferació.

El trastorn depressiu, per la seva banda, també s'ha relacionat directament amb una reducció de la neurogènesi hipocampal adulta<sup>27</sup>. Alguns estudis han demostrat que la disminució de la neurogènesi en pacients depressius es troba relacionada amb la reducció del volum hipocampal, una de les característiques principals d'aquests pacients<sup>25</sup>. De la mateixa manera, molts estudis han anat demostrant al llarg dels darrers anys com l'activitat física, un dels principals factors positius comentats que incrementa la neurogènesi hipocampal, seria un bon mètode per poder fer front a la depressió, pal·liant els seus símptomes<sup>25,26</sup>.

Per altra banda, s'ha observat que una exposició constant a la llum pot provocar conseqüències patològiques en rates adultes que han patit una lesió cerebral traumàtica. Aquestes conseqüències patològiques es poden relacionar amb una inhibició de la neurogènesi, entre altres aspectes com una disminució del pes corporal o una reducció de la supervivència neuronal. Aquest estudi és important per relacionar-ho amb l'exposició permanent que pateixen alguns pacients amb aquesta patologia als hospitals, fet que pot agreujar els símptomes<sup>29</sup>.

Per tant, el coneixement i enteniment de la interacció del sistema circadià amb la neurogènesi hipocampal, tant en animals d'experimentació com als humans, és molt important per poder estudiar de manera més eficaç alguns aspectes relacionats amb l'aprenentatge i la memòria, a més de conèixer millor algunes malalties tant importants en l'actualitat com l'Alzheimer.

## Conclusions

A partir de l'anàlisi dels resultats obtinguts i de la comprensió de la literatura científica, es poden establir quatre conclusions principals:

- No s'observen diferències significatives en la proliferació cel·lular a l'hipocamp de rata mascle adulta quan es comparen les cèl·lules positives en Ki-67 de les diferents hores del dia avaluades.
- S'observa un major nombre de cèl·lules Ki-67 positives durant la fase obscura, de manera que la neurogènesi hipocampal adulta és superior durant el període d'obscuritat en comparació a la fase de llum en rates mascle adultes.
- El sistema circadià regula la funció hipocampal (aprenentatge i memòria) a través del control de la proliferació cel·lular d'aquesta regió del cervell.
- L'estudi de la relació entre el sistema circadià i la proliferació cel·lular a l'hipocamp adult ha permès establir les bases d'algunes patologies com la depressió i l'Alzheimer, a més d'obrir el coneixement en l'àmbit de les teràpies.

## Agraïments

Aquest estudi va ser elaborat al Laboratori de Neurofarmacologia de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Agraïments al grup de col·laboradors/es del laboratori, Cristian Bis Humbert, Elena Hernández Hernández, Sandra Ledesma Corvi, i a la meua tutora, M. Julia Garcia Fuster, pel suport i l'ajuda prestada durant el desenvolupament del treball.

## Bibliografia

1. Albrecht, U. Molecular mechanisms in mood regulation involving the circadian clock. *Frontiers in Neurology* vol. 8 (2017).
2. Ritmos circadianos (Consultada dia 15/4/2021). *National Institute of General Medical Sciences*. <https://www.nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/circadian-rhythms-spanish.aspx>.
3. Weger, M., Diotel, N., Dorsemans, A. C., Dickmeis, T. & Weger, B. D. Stem cells and the circadian clock. *Developmental Biology* vol. 431 111–123 (2017).
4. Terzibasi-Tozzini, E., Martinez-Nicolas, A. & Lucas-Sánchez, A. The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 70 164–176 (2017).
5. Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S. & Turek, F. W. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res. Heal.* **25**, 85–93 (2001).
6. Smarr, B. L., Jennings, K. J., Driscoll, J. R. & Kriegsfeld, L. J. A time to remember: The role of circadian clocks in learning and memory. *Behav. Neurosci.* **128**, 283–303 (2014).
7. Bouchard-Cannon, P., Mendoza-Viveros, L., Yuen, A., Kærn, M. & Cheng, H. Y. M. The Circadian Molecular Clock Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis by Controlling the Timing of Cell-Cycle Entry and Exit. *Cell Rep.* **5**, 961–973 (2013).
8. McCauley, J. P. *et al.* Circadian Modulation of Neurons and Astrocytes Controls Synaptic Plasticity in Hippocampal Area CA1. *Cell Rep.* **33**, (2020).
9. Rakai, B. D., Chrusch, M. J., Spanswick, S. C., Dyck, R. H. & Antle, M. C. Survival of adult generated hippocampal neurons is altered in circadian arrhythmic mice. *PLoS One* **9**, (2014).
10. Carter, S. J. *et al.* A matter of time: study of circadian clocks and their role in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 549–560 (2016).
11. Hernández-Rosas, F. & Santiago-García, J. Ritmos circadianos, genes reloj y cáncer. *Arch. Med.* **6**, 3 (2010).
12. Kim, P. *et al.* Coupling the circadian clock to homeostasis: The role of period in timing physiology. *Endocr. Rev.* **40**, 66–95 (2018).

13. Guilding, C. & Piggins, H. D. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: Are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience* vol. 25 3195–3216 (2007).
14. Olivares, J., Juárez, E. & García, F. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje Hippocampus: neurogenesis and learning. *Rev Med UV* 20–28 (2015).
15. Hasegawa, S. *et al.* Hippocampal clock regulates memory retrieval via Dopamine and PKA-induced GluA1 phosphorylation. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
16. Mei, L. *et al.* Long-term in vivo recording of circadian rhythms in brains of freely moving mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4276–4281 (2018).
17. Von Bohlen Und Halbach, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research* vol. 345 1–19 (2011).
18. Kozareva, D. A., Cryan, J. F. & Nolan, Y. M. Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. *Aging Cell* vol. 18 (2019).
19. Mandyam, C. D. & Koob, G. F. The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in Neurosciences* vol. 35 250–260 (2012).
20. Mahmoud, R., Wainwright, S. R. & Galea, L. A. M. Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: Regulation, implications, and potential mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology* vol. 41 129–152 (2016).
21. D’Amico, L. A., Boujard, D. & Coumilleau, P. The Neurogenic Factor NeuroD1 Is Expressed in Post-Mitotic Cells during Juvenile and Adult *Xenopus* Neurogenesis and Not in Progenitor or Radial Glial Cells. *PLoS One* **8**, 66487 (2013).
22. Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. & Wojtowicz, J. M. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Methods* **115**, 97–105 (2002).
23. Chawana, R. *et al.* The Distribution of Ki-67 and Doublecortin Immunopositive Cells in the Brains of Three Microchiropteran Species, *Hipposideros fuliginosus*, *Triaenops persicus*, and *Asellia tridens*. *Anat. Rec.* **299**, 1548–1560 (2016).
24. Nokia, M. S. *et al.* Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. *J. Physiol.* **594**, 1855–1873 (2016).
25. Ernst, C., Olson, A. K., Pinel, J. P. J., Lam, R. W. & Christie, B. R. Antidepressant effects of exercise: Evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *Journal of Psychiatry and Neuroscience* vol. 31 84–92 (2006).
26. Ma, C. L. *et al.* Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behavioural Brain Research* vol. 317 332–339 (2017).
27. Kochman, L. J., Fornal, C. A. & Jacobs, B. L. Suppression of hippocampal cell proliferation by short-term stimulant drug administration in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 2157–2165 (2009).

28. Kent, B. A. & Mistlberger, R. E. Sleep and hippocampal neurogenesis: Implications for Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* vol. 45 35–52 (2017).
29. Li, D. *et al.* Environmental Circadian Disruption Worsens Neurologic Impairment and Inhibits Hippocampal Neurogenesis in Adult Rats After Traumatic Brain Injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 1045–1055 (2016).
30. Tamai, S. I., Sanada, K. & Fukada, Y. Time-of-day-dependent enhancement of adult neurogenesis in the hippocampus. *PLoS One* **3**, (2008).
31. Malik, A., Kondratov, R. V., Jamasbi, R. J. & Geusz, M. E. Circadian clock genes are essential for normal adult neurogenesis, differentiation, and fate determination. *PLoS One* **10**, (2015).
32. Bergmann, O., Spalding, K. L. & Frisén, J. Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
33. García-Cabrerizo, R., Ledesma-Corvi, S., Bis-Humbert, C. & García-Fuster, M. J. Sex differences in the antidepressant-like potential of repeated electroconvulsive seizures in adolescent and adult rats: Regulation of the early stages of hippocampal neurogenesis. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **41**, 132–145 (2020).
34. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
35. Avidin, Biotin, and Streptavidin (Consultada dia 17/5/2021). *Rockland Antibodies and Assays*. <https://rockland-inc.com/avidin-biotin-streptavidin.aspx>.