



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Evolució i caràcter hereditari del ritme d'activitat motora de la rata**

Trinitat Cambras Riu



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

FACULTAT DE FARMACIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

EVOLUCIO I CARACTER HEREDITARI  
DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA DE LA RATA

Memòria presentada per Na  
Trinitat Cambras i Riu per a  
optar al grau de Doctor en  
Farmàcia.

Director:

Dr. Antoni Díez i Noguera

Barcelona, Desembre de 1986.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082946

- 1. INTRODUCCIO
- 1.1. RITMES EN ELS ORGANIMES VIUS. NECESSITAT I ADAPTACIO
- 1.2. PARAMETRES QUE DEFINEIXEN ELS RITMES
- 1.3. TIPUS DE RITMES
  - 1.3.1. RITMES ULTRADIARIS
  - 1.3.2. RITMES CIRCADIARIS
  - 1.3.3. RITMES INFRADIARIS
- 1.4. CARACTERISTIQUES DELS RITMES
  - 1.4.1. NATURALESA ENDOGENA DELS RITMES CIRCADARIS
    - 1.4.1.1. Periode endògen, tau.
    - 1.4.1.2. manipulacions del tau
  - 1.4.2. CAPACITAT DE SINCRONITZACIO
    - 1.4.2.1. Principals sincronitzadors
      - 1.4.2.1.1. Cicle d'accés al menjar
      - 1.4.2.1.2. Camps magnètics
      - 1.4.2.1.3. Temperatura
      - 1.4.2.1.4. Influència social
      - 1.4.2.1.5. Cicles de llum
        - 1.4.2.1.5.1. Efectes de la llum
        - 1.4.2.1.5.2. Efectes de la llum constant sobre els ritmes
    - 1.4.2.2. Enmascarament o "masking".
  - 1.4.3. CARACTER HEREDITARI DELS RITMES
- 1.5. ESTRUCTURA DEL SISTEMA CIRCADIARI
  - 1.5.1. OSCIL·LADORS
    - 1.5.1.1. Nucli supraquiasmàtic
      - 1.5.1.1.1. Anatomia del NSQ
      - 1.5.1.1.2. Fisiologia del NSQ

- 1.5.1.2. Glandula pineal
- 1.5.1.3. Altres oscil.ladors
- 1.5.2. EVIDENCIA DE MULTIPLES OSCIL.LADORS
- 1.5.2.1. Dissociació o "splitting"
- 1.5.2.2. Desincronització interna
- 1.5.3. POSSIBLE ESTRUCTURA DEL SISTEMA CIRCADIARI DE MAMIFERS
- 1.6. ONTOGENIA DELS RITMES CIRCADIARIS
- 1.6.1. INFLUENCIA MATERNA
- 1.6.2. DESENVOLUPAMENT DELS RITMES EN MAMIFERS
- 1.6.2.1. En humans
- 1.6.2.2. En rates
- 1.6.2.2.1. Ritmes del NSQ
- 1.6.2.2.2. Ritmes de la pineal
- 1.6.2.2.3. Ritmes adrenals
- 1.6.2.2.4. Ritme d'activitat motora
- 1.6.3. INFLUENCIA DE LA EDAT
- 1.7. DIFERENCIES ENTRE SEXES
- 1.7.1. DIFERENCIES EN RITMES
- 1.7.2. INFLUENCIA DE LES HORMONES
- 1.8. RITME D'ACTIVITAT MOTORA
- 1.9. IMPORTANCIA PRACTICA DE LA CRONOBIOLOGIA
- 1.9.1. INTERPRETACIO I DISSENY D'EXPERIMENTS
- 1.9.2. MESURA DE RITMES
- 2. PROPOSIT

- 3. MATERIAL I METODEDES
- 3.1. MATERIAL
- 3.1.1. ANIMALS
- 3.1.2. CONDICIONS DE MANTENIMENT
- 3.1.3. APARELLS
- 3.1.3.1. Unitats de detecció de l'activitat motora
- 3.1.3.2. Comptadors, multiplexor i impressora
- 3.1.3.3. Unitats pel tractament de dades
- 3.2. EXPERIMENT
- 3.2.1. DISSENY
- 3.2.2. ASPECTES PRACTICS
- 3.3. ANALISI MATEMATICA I ESTADISTICA
- 3.3.1. PERIODOGRAMA
- 3.3.1.1. Càlcul del períodegrama
- 3.3.1.2. Càlcul de la significació del  $\chi^2$
- 3.3.2. ANALISI DE MODELS LINIALS
- 3.3.2.1. Càlcul
- 3.3.3. ANALISI DE FOURIER
- 3.3.3.1. Plantejament
- 3.3.3.2. Estimació dels paràmetres
- 3.3.3.3. Descomposició de la suma de quadrats
- 3.3.3.4. Teorema de Parseval i espectre de potència
- 3.3.3.5. Significació dels harmònics
- 3.3.4. ANALISI DE L'EVOLUCIO DE PARAMETRES MOTORS
- 3.3.4.1. Funció d'ajust pel CPH1
- 3.3.4.1.1. Significació dels paràmetres de la funció
- 3.3.4.2. Funció d'ajust pel CPH8
- 3.3.4.2.1. Significació dels paràmetres de la funció
- 3.3.4.3. Funció d'ajust per l'AMT
- 3.3.4.3.1. Significació dels paràmetres de la funció

- 3.3.5. ESTADÍSTIC A
  - 3.3.5.1 . Definició
  - 3.3.5.2. Càlcul
  - 3.3.5.3. Distribució
  - 3.3.5.4. Significació
- 3.3.6. PROVA XI QUADRAT
- 3.3.7. PROBABILITAT EXACTA DE FISHER
- 3.3.8. ANALISI MULTIVARIANT
  - 3.3.8.1. Anàlisi multivariant de la varianza
- 3.3.9. METODES FACTORIALS
  - 3.3.9.1. Anàlisi de components principals
  - 3.3.9.2. Anàlisi de distàncies euclídiess
  - 3.3.9.3. Estudi de la proximitat
    - 3.3.9.3.1. Càlcul dels centroides i les el·lipsses
    - 3.3.9.3.2. Varianza entorn els centroides
  - 3.3.9.4. Anàlisi discriminant
- 3.3.10. METODES DE CLASSIFICACIO
  - 3.3.10.1. Agregació d'elements
    - 3.3.10.1.1. Agregació jeràrquica
      - 3.3.10.1.1.1. Mètode de la mínima perdua d'inèrcia
      - 3.3.10.1.1.2. Construcció del dendograma
    - 3.3.10.1.2. Agregació no jeràrquica
      - 3.3.10.1.2.1. Agregació gravitatòria
      - 3.3.10.1.2.2. Agregació gravitatòria limitada
        - 3.3.10.1.2.2.1. Algoritme de càlcul
  - 3.3.10.2. Funcions de classificació
- 4. RESULTATS
  - 4.1. CÀLCUL DEL PERIODE ENDOGEN TAU
  - 4.2. EVOLUCIO DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA
    - 4.2.1. FUNCIO D'ACTIVITAT MOTORA
      - 4.2.1.1 . Actograma

- 4.2.1.2. Doble gràfica d'activitat
- 4.2.2. ESPECTRES DE POTENCIA
- 4.2.2.1. Histogrames
- 4.2.2.1.1. Histogrames individuals
- 4.2.2.1.2. Histogrames mitjans segons sexes i famílies
- 4.2.2.1.3. Histogrames mitjans segons famílies
- 4.2.2.1.4. Histogrames mitjans segons sexes
- 4.2.2.1.5. Histogrames mitjans totals
- 4.2.2.2. Matriu gràfica d'espectres
- 4.2.2.2.1. Matrius individuals
- 4.2.2.2.2. Matrius mitjanes segons sexes i famílies
- 4.2.2.2.3. Matrius mitjanes segons famílies
- 4.2.2.2.4. Matrius mitjanes segons sexes
- 4.2.2.2.5. Matrius mitjanes totals
- 4.2.2.3. Patró d'espectres de potències
- 4.2.3. EVOLUCIO DE DIFERENTS PARAMETRES DEL RITME
- 4.2.3.1. Evolució de l'AMT
- 4.2.3.2. Evolució del CPH1
- 4.2.3.2.1. Funció de correlació per el CPH1
- 4.2.3.3. Evolució del CPH8
- 4.2.3.3.1. Funció de correlació per el CPH8
- 4.2.3.4. Mitjanes de l'evolució per famílies
- 4.2.4. RELACIO ENTRE AMT I CPHC DURANT EL DESENVOLUPAMENT DE L'ESPECTRE
- 4.2.4.1. Prova 1: Dobles gràfiques d'activitat suavitzades
- 4.2.4.2. Prova 2: Estadistic A
- 4.2.4.3. Prova 3: Funció de correlació de la corba d'activitat i relació amb el CPH1
- 4.2.5. VARIACIO DEL RITME AMB LA EDAT
- 4.3. CARACTER HEREDITARI DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA
- 4.4.1. ANALISI DELS PARAMETRES DEL RITME
- 4.4.1.1. Tau
- 4.4.1.2. CPH1
- 4.4.1.3. AMT

- 4.4.2. ANALISI DEL PATRO DEL RITME
- 4.4.2.1. Anàlisi per components principals
- 4.4.2.2. Espectres mitjans normalitzats
- 4.4.2.3. Matriu de distàncies euclídiess
- 4.4.2.3.1. Reducció de dimensions
- 4.4.2.3.2. El.lipses de confiança
- 4.4.2.4. Anàlisi multivariant dels Espectres mitjans
- 4.4.2.5. Funció de classificació
- 4.4.2.6. Mètodes d'agregació
- 4.4.2.6.1. Dendograma
- 4.4.2.6.2. Agregació limitada

5. DISCUSSIO

5.1. EXPERIMENT

- 5.1.1. LLUM CONSTANT
- 5.1.2. TALLS DEL SUBMINISTRAMENT ELECTRIC
- 5.1.3. MODIFICACIONS DEL DISSENY
- 5.1.4. PARENTIU DE LES RATES
- 5.1.5. SINCRONITZACIO

5.2. PERIODE ENDOGEN, TAU

5.3. EVOLUCIO DEL RITME

- 5.3.1. EVOLUCIO DEL CPH1 I CPH8 AMB EL TEMPS
- 5.3.2. RELACIO ENTRE AMT I CPHC
- 5.3.3. VARIACIO DEL RITME AMB LA EDAT

5.4. DIFERENCIES ENTRE SEXES

5.5. CARACTER HEREDITARI



5.6 METODOLOGIA

6. CONCLUSIONS

7. BIBLIOGRAFIA

LLISTA D'ABREVIATURES

AM: Activitat motora

AMT: Activitat motora total. Representa el valor mitjà diari

CFR: Corba de fase de resposta

CP: Contingut de potència

CPHC: Contingut de potència de l'harmònic circadiari

CPHn: Contingut de potència del n-èssim harmònic

EP: Espectre de potències

FAM: Funció d'activitat motora

FF: Fosc constant

Ø: Fase d'un ritme

HIDMT: Hidroxiindol-O-metil transferasa

LF: cicle de llum-fosc. Es pot indicar també la durada de la fase de llum i de fosc (en hores). Per exemple LF 14:10 significa un cicle diari de 14 hores de llum i 10 de fosc

NAT: N-acetil transferasa

NGL: Nucli geniculat lateral

NSQ: Nucli supraquiasmàtic

TAU( $\tau$ ): Període d'un ritme biològic

VMH: Nucli ventromedial de l'hipotàlem

## 1. INTRODUCCIO.

### 1.1. RITMES EN ELS ORGANISMES VIUS. NECESSITAT I ADAPTACIO.

Es un fet ben observat que la gran majoria d'organismes presenten canvis cíclics en les seves funcions biològiques. No es gens estrany d'observar com tots els animals i les persones alternen els estats de vigília i son d'una manera periòdica i constant. Igualment tampoc és sorprenent el fet que unes plantes obrin les seves flors a unes hores del dia i les tanquin a unes altres. A la vista d'aquests fets es pot dir que els organismes segueixen el ritme dia-nit de 24 hores. Una anàlisi més detinguda dels fets mostra que no es un fet tan senzill com un seguiment del cicle solar. Els organismes presenten, en la majoria de paràmetres fisiològics, una gran varietat de ritmes de diferents naturaleses que no necessàriament tenen relació amb el cicle dia-nit i que, a més, es mantenen encara que les condicions d'il.luminació restin constants. Es poden observar ritmes de paràmetres bioquímics, com d'hormones a la sang o d'activitats enzimàtiques de 24 hores, ritmes de paràmetres fisiològics com el batec del cor i el ritme de respiració de freqüències molt ràpides, el cicle de son-vigília de 24 hores o el cicle menstrual de la dona de 28 dies. També s'han descrit ritmes de paràmetres conductuals com ritmes de memòria a curt i llarg termini (74). A més, tot encara resulta més complex si es té en compte que hi ha ritmes que provenen de la sincronització entre tots els individus d'una població respecte a esdeveniments que només succeeixen una vegada a la vida de cada individu. Aquest pot ser el cas del naixement o la metamorfosi dels insectes, que presenten ritmes circadianis tot i que els individus no sobreviuen més d'unes hores. L'explicació vé de que aquests fets, per ser de gran importància a la vida dels individus, cal que es produeixin sincronitzats amb

tota la població i a una hora òptima del dia. Per exemple, una mosca d'aigua, que té un període molt curt d'exposició del substracte sobre el que posa els ous, requereix una sincronització molt acurada tant de la sortida de la larva com de la conducta sexual respecte a l'hora del dia (164).

Tots aquests fenòmens rítmics tenen una explicació si es pensa en la gran varietat de canvis ambientals a què estan sotmesos els éssers vius. Així, es poden citar el cicle dia-nit degut a la rotació de la terra al voltant del seu eix, un cicle lunar de 28 dies i un ritme anual de la terra al voltant del sol que genera les estacions. En general, tots els canvis periòdics de qualsevol astre en l'univers són potencialment capaçs de produir canvis rítmics en els éssers vius.

Segons tot el comentat fins ara, resulta evident que la adaptació de qualsevol organisme al medi extern implica una adaptació als cicles ambientals, es a dir sorgeix la necessitat d'organitzar-se internament segons el temps. L'adaptació a la realitat circadiària del nostre planeta és condició "sine qua non" de vida, de manera que un organisme que no s'adapti als canvis cíclics tendirà a desaparèixer (107). Aquest fet s'ha comprovat experimentalment en veure que alteracions induïdes al sistema circadiari per canvis de fase disminueixen la expectativa de vida d'alguns invertebrats (14). De resultes de tota la sèrie de periodicitats ambientals, els elements vius han anat construint tota una xarxa, altament complexa, d'interaccions temporals en al seva genètica i bioquímica.

El descobriment dels ritmes en els organismes vius va suposar un gran canvi en la idea preconcebuda de les seves característiques, passant del concepte d'homeostàsia que va ser considerada durant molts anys com a la característica fonamental dels éssers vius, a considerar l'activitat rítmica com a propietat fonamental de la matèria viva (194). A més s'ha demostrat que energèticament es més econòmic pels organismes el disposar d'un sistema oscil·latori (83).

La cronobiologia és la ciència que estudia els processos rítmics dins dels organismes vius. La seva importàcia ve de que els organismes estan estructurats no només anatòmicament i fisiològica, sino que també estan estructurats en el temps. En un principi es va postular que una finalitat dels ritmes fóra la de preparar l'organisme per a desenvolupar diferents activitats segons l'hora del dia, es a dir, en els organismes hi hauria una compartimentació temporal, de manera que en un mateix espai físic es succeïssin diferents processos en diferents temps. També s'ha proposat l'única funció dels ritmes circadianis en els organismes es la de donar un programa temporal endogen per a la sincronització adaptativa de la fisiologia i conducta d'un animal al seu entorn cíclic, és a dir, els ritmes servirien exclusivament per a l'adaptació al planeta. Sigui qualsevol dels dos casos, el fet és que dins els organismes hi ha un sistema que actua com a rellotge biològic i que és capaç de mesurar el temps astronòmic organitzant, segons aquest, l'estructura temporal interna.

D'altra banda, hi ha molts processos rítmics que no estan relacionats amb els canvis ambientals, com per exemple, el ritme de la respiració o del bategar del cor, però que en canvi contribueixen al manteniment de la integritat funcional del medi intern, estant relacionats molts d'ells amb la transferència d'energia (43). En homeoterms, les freqüències d'aquests ritmes estan relacionades amb el metabolisme mitjà dels teixits (126). D'aquesta manera, mentre que les periodicitats ambientals com el canvi dia-nit, fases de la lluna i estacions són comuns per a tots els individus, la vida dels homeoterms va lligada a una escala de temps en relació a la mida dels animals i al seu consum d'energia.

L'estudi dels ritmes va adquirint cada cop més importàcia, ja no sols pel fet d'un millor coneixement dels éssers vius, sinó també des del punt de vista pràctic; per exemple en el camp de la medicina en el

que s'estudien els ritmes en estat de salut i les seves alteracions en diferents patologies. S'ha vist en l'home que a causa d'alteracions dels ritmes per canvis horaris, sigui per torns de treball o per vols transmeridians (jet-lag) pot manifestar diverses patologies a nivell de desordres en el son, problemes gastro-intestinals o cardío-vasculars (155). Igualment s'han descrit moltes malalties, com els estats depressius, que es manifesten juntament amb alteracions en alguns ritmes circadianis (206,262). Així s'ha dit que en estats normals de salut, és molt més significatiu trobar que no hi ha ritmes en un paràmetre determinat de l'organisme que no pas trobar que n'hi ha, ja que el primer cas indicaria un mal funcionament del organisme. Com a conseqüència, han sorgit els conceptes de cronoteràpia, que tractaria d'un restabliment de les funcions rítmiques normals de l'organisme manipulant tan com fos possible el sistema circadiani i de cronofarmacologia, branca de la farmacologia que té en compte com oscil·len els diferents paràmetres fisiològics o bioquímics per tal d'observar quin és el millor moment del dia per a l'administració d'un fàrmac i quin moment del dia i de l'any el fàrmac és més efectiu o menys tòxic.

## 1.2. PARAMETRES QUE DEFINEIXEN ELS RITMES

Per a facilitar l'estudi de qualsevol tipus de ritme, cal que aquest es consideri ajustat a una funció matemàtica. Normalment aquesta funció és una ona de tipus sinusoidal. Segons això els ritmes vénen definits pels mateixos paràmetres emprats per definir-los en matemàtiques o física. Els principals paràmetres utilitzats són:

- PERIODE, definit com la durada d'un cicle complet d'una variació rítmica. S'expressa en unitats de temps. El període que segueix un ritme en curs lliure, és a dir en condicions ambientals constants, és anomenat tau,  $\tau$ .

-ACROFASE, és l'espai de temps estimat en què s'arriba al punt màxim del ritme considerat, i per a un període determinat. L'acrofase es dona en relació a una referència de fase, que pot ser una hora concreta o bé l'acrofase d'una altra variable. En aquest darrer cas es parla de relació de fase entre dos ritmes.

- AMPLITUD, és el màxim de variabilitat deguda al ritme. En un ritme purament sinusoidal, és la distància des del valor mig del ritme fins al punt màxim. Es considera que dues vegades l'amplitud és la diferència que hi ha entre els valors màxim i mínim del cicle.

-MESOR, és la mitjana ajustada del ritme. Si l'interval de temps entre les dades de les observacions de la sèrie a analitzar es constant, el mesor equival a la mitjana aritmètica.

Apart d'aquests paràmetres, que són els que propiament defineixen l'oscil·lació, també s'utilitza en l'estudi dels ritmes, la relació  $\alpha/\tau_0$  que és la relació existent entre la durada de la fase d'activitat d'un ritme ( $\alpha$ ) i la fase de repòs ( $\tau_0$ ).

### 1.3. TIPUS DE RITMES.

Segons la freqüència dels ritmes, aquests es poden classificar en tres grans grups: ultradiaris, circadiaris i infradiaris.

#### 1.3.1. RITMES ULTRADIARIS.

Són els ritmes de freqüència ràpida, superior a la diària, que tenen un període inferior a les 20 hores. Dins d'ells trobem el bategar del cor, amb un període aproximat a un segon, i el ritme de la respiració de 5-6 segons. Un ritme ultradiari important per la seva aplicació en medicina és el ritme de REM d'un període aproximat, en humans, de 90 minuts. La integritat d'aquest ritme es clínicament útil com a indicació de la integritat del cervell. La alternança REM/NREM s'ha utilitzat per determinar la prognosi de malalts en coma (169). S'ha trobat que molts paràmetres segueixen al mateix temps ritmes de diferents períodes, per exemple, l'activitat motora de les rates que predominantment segueix un ritme de 24 hores, segueix conjuntament ritmes ultradiaris. Igual succeeix amb els nivells de cortisol que segueixen ritmes circadiaris, ultradiaris i infradiaris. Tot i que hi ha ritmes ultradiaris que tenen importància per ser submúltiples dels circadiaris, en l'organisme els ritmes ultradiaris i circadiaris són autònoms. Per exemple, no hi ha cap paral·lelisme ni sincronització entre el ritme REM/NREM i cap subharmònic del cicle circadiari (154).

#### 3.2. RITMES CIRCADIARIS

Són els de període aproximat a les 24 hores, entre 20 i 28 hores. Són els més importants i millor estudiats ja que dins d'ells es troben la gran majoria dels ritmes de funcions dels organismes. S'ha proposat que el seu origen té lloc de resultes de la influència de la



rotació de la terra, cicle de sol, sobre els essers vius durant el curs de l'evolució. S'han descrit ritmes circadianis en un gran nombre de paràmetres i en gran quantitat d'espècies, la majoria dels quals seran comentats més endavant. En el ratolí, els paràmetres que segueixen ritmes circadianis es mostren a la figura 1. Dins d'ells cal destacar el ritme d'activitat motora de rosegadors, ja que es el que s'estudiarà en aquest treball.

### 1.3.3. RITMES INFRADIARIS

Tenen un període superior a les 28 hores. Són de freqüències lentes o inferiors a la diària. Dins d'ells es destaquen el cicle menstrual de la dona de 28 dies i els cicles de zel dels animals.

Un apartat especial dins d'aquest grup mereixen els ritmes circanuals d'aproximadament un any de durada. Alguns autors han considerat aquests ritmes com a expressions dels ritmes endògens que sincronitzen amb un oscil·lador ambiental de període d'un any (12). Tot i així, hi ha suficient evidència experimental com per demostrar que no és tan sols una sincronització, sinó que realment existeix un oscil·lador endogen circanual dins dels organismes (69). Dins d'aquests ritmes hi ha els que tenen relació amb el cicle de la reproducció, que impliquen una sincronització entre els diferents individus d'una espècie, sobretot en els no socials per tal de sincronitzar almenys un cop a l'any tant la maduresa dels òrgans reproductors dels dos sexes, com el moment de l'aparellament per tal que les cries neixin en les millors condicions ambientals. Un ritme circanual especial és el de la hibernació. En els animals hivernants es presenta un ritme endogen anual de pèrdua de pes i normalment de reducció de la temperatura corporal i metabolisme (6). Un altre ritme especial és el de les migracions d'ocells. Es pressuposa que les aus migratòries disposen d'un rellotge intern que els permet saber quan han de

començar el vol. Alguns autors han proposat que els canvis de llargada del dia de les diferents estacions activen algun mecanisme fisiològic responsable de les migracions. No obstant això, s'ha trobat que aus migratòries en cautivitat en laboratoris, sense cap influència externa sobre el dia, manifesten un increment de l'activitat i canvis en la seva conducta molt notables en l'època en què les aus en llibertat comencen a migrar, fet que suposa que realment el ritme de migració circanual és innat al mateix individu (92). S'han descrit també ritmes setmanals en moltes funcions, tot i que aquests no s'han pogut relacionar amb canvis ambientals (107).

#### 1.4. CARACTERISTIQUES DELS RITMES

Els ritmes biològics estan caracteritzats per tres fets importants. El primer és que són de naturalesa endògena, és a dir, es manifesten encara que les condicions ambientals restin constants i ho fan segons un ritme propi de període tau (període en curs lliure). En segon lloc, en condicions naturals el rellotge intern o biològic és sincronitzat o "posat a l'hora" per estímuls ambientals periòdics, sent el més potent el cicle de llum-fosc. Per últim, és un fet característic que els ritmes són de naturalesa hereditària.

##### 1.4.1. NATURALESA ENDOGENA DELS RITMES CIRCADIARIS.

Les primeres dades sobre la naturalesa endògena dels ritmes dels organismes vius van ser trobades en plantes. Ja en 1729, l'astrònom francès de Mairan va comunicar com els moviments de les fulles d'una planta heliotropa (Mimosa pudica) segueixen un ritme segons el cicle solar, però aquest ritme es mantenia encara que la planta estigués en un lloc on el sol no arribés. Molts experiments d'observació d'obertura i tancament de les

flors en condicions de foscor constant es van realitzar fins que en 1873 Pfeffer (172) va suggerir que aquest moviment de les plantes seguia un ritme endogen amb un període que variava lleugerament de les 24 hores, però que quan estava sota la influència d'un fotoperíode de 12/12 hores sincronitzava amb ell.

En els mamífers la naturalesa endògena dels ritmes no va ser coneguda fins a mitjans del segle passat en què Ogle (167) va observar que el ritme de temperatura de l'home era independent de les influències externes. Tot i així, no va ser fins a començaments d'aquest segle quan es va reconèixer que les ritmicitats dels mamífers no depenien de les condicions ambientals i van ser considerades com l'expressió d'un paràmetre fisiològic intern. Són destacables els experiments de Simpson i Galbraith (226) que van mesurar la temperatura rectal i axil·lar de 5 micos cada dues hores i durant 60 dies seguits. Van demostrar que la temperatura presenta un ritme circadiari fins i tot en condicions de FF o LL. Aquest ritme es sincronitzava amb un cicle de llum de 24 hores ja que si s'invertia el cicle, el ritme també s'anava invertint gradualment.

La naturalesa endògena del sistema circadiari humà no va ser confirmada fins fa poc temps quan Aschoff i Weber (15) van aïllar individus en una habitació en absència de referències temporals externes i Siffre (224) va viure sol en una cova durant dos mesos. Els dos experiments mostraven com el període en curs lliure dels humans era aproximadament de 25 hores, indicant com, a l'igual que els altres animals, els éssers humans presentaven un sistema circadiari endogen.

#### 1.4.1.1. Període endogen, tau

Actualment, és un fet plenament conegut que la majoria dels ritmes dels éssers vius perduren encara que les condicions ambientals restin constants. Quan un organisme és deixat en condicions ambientals constants, es quan es manifesta el propi període endogen del ritme

en curs lliure. Aquest acostuma a ser lleugerament diferent de les 24 hores i és l'anomenat tau. El tau d'un ritme determinat és un paràmetre força estable i difícil d'alterar. Pittendrigh (179) va anunciar que la principal característica del tau és la seva homeostàsia. Es considera que cada espècie té un tau característic per a un ritme determinat i que els taus dels individus de la espècie oscil·len al voltant d'aquest tau. El fet que els organismes no segueixin el ritme exacte de 24 hores, no implica que el seu sistema d'organització falli, ni que s'hagi produït un error en la naturalesa. Sembla ser que tot i que els organismes sincronitzen amb un període ambiental de 24 hores, s'ha produït a la naturalesa una selecció dels sistemes circadianis de tau lleugerament diferent a les 24 hores. Aquesta suposició va sorgir de diferents experiments on es va demostrar com un organisme sincronitza pitjor amb un període de 24 hores, mentre el seu període endogen sigui més proper a les 24 hores. Paral·lelament es va observar com organismes en presència de dos ritmes ambientals, un de 24 hores i un altre igual al seu propi tau, sincronitzen millor amb el període de 24 hores que no amb el seu propi període endògen (180,181). Aschoff (9) va suggerir que el nivell d'excitació d'un organisme està relacionat amb la freqüència de l'oscil·lador circadiani. En aquest aspecte s'ha trobat que canvis en el tau induïts per variacions de temperatura o d'intensitat de llum estan fortament correlacionats amb el nivell d'activitat.

La gran majoria de ritmes poden perdurar molt de temps en condicions ambientals constants. S'ha vist com micos cecs mantenen un ritme molt exacte durant més de 10 anys (205) i com ratolins mantinguts en condicions de llum constant durant 6 generacions mantenen un ritme circadiani d'activitat motora força constant (11).

En alguns casos alguns ritmes desapareixen al cap d'un cert temps en ser deixats en condicions constants, sobretot en llum constant. Però, en la majoria de vegades, els ritmes es mantenen encara que es poden

produir diferents fenòmens, com la dissociació de ritmes, o "splitting" i la desincronització interna, els quals seran comentats posteriorment

#### 4.1.2. MANIPULACIONS DEL TAU.

Tot i que el tau és un paràmetre força estable i difícil d'alterar, s'ha vist com el tau d'un ritme en condicions constants pot venir influït, durant més de 100 dies, per les condicions a que els animals han estat prèviament sotmesos abans de ser deixats en curs lliure. Aquests fenòmens són els anomenats post-efectes o "after-effects" (154,177). Es considera que per disposar d'un període estable un cop l'animal s'ha deixat en condicions constants, és a dir, per evitar els post-efectes, han de transcórrer de 100 a 200 dies (180,181).

Externament el tau pot ser modificat per l'acció d'alguns fàrmacs tot i que no es coneix encara el mecanisme pel qual és modificat. Així, s'ha trobat:

- L'aigua pesada (D2O). Administrada als animals, pot disminuir la velocitat de l'oscil·lador circadiari, allargant el tau (45). S'ha trobat com hámsters als quals se'ls subministrava D2O amb l'aigua de beguda, produïen un allargament del tau que era proporcional a la concentració de D2O. A més, el principi de la fase d'activitat anava sincronitzada cada dia més tard amb el moment d'apagar-se les llums; així, amb un 10% de D2O es produïa l'inici d'activitat a les 3-4 hores del canvi de llum.

- Fàrmacs antidepressius:

1) Liti. S'ha trobat que el liti escurça el tau en invertebrats com l'Aplysia (234). Al contrari, el liti allarga el període d'activitat en les rates i els hámsters (134, 272). Igualment en les rates, el liti allarga els ritmes neuroendocrins d'electròlits en

plasma i de receptors en el sistema nerviós central. En humans sans, el liti enlenteix el ritme de temperatura corporal i cicles de son (116).

2) Altres antidepressius. Altres fàrmacs com la clorgilina i la imipramina, allarguen el tau del ritme d'activitat motora dels hámsters (272) i endarrereixen la posició de fase de molts ritmes de receptors de neurotransmissors del SNC (118,119,273). Els efectes dels fàrmacs antidepressius sobre els ritmes, així com el fet que malalts depressius manifestin alteracions en alguns ritmes, obre una porta a nous tractaments i possibles teories sobre la depressió.

#### 1.4.2. CAPACITAT DE SINCRONITZACIO.

Tal com s'ha comentat anteriorment, el sistema circadiari, que té el seu propi període en curs lliure, es pot sincronitzar amb un ritme extern de 24 hores. En aquest cas el sistema intern adquireix el període del ritme extern mantenint amb ell una relació de fase concreta. La sincronització només pot produir-se dins d'uns límits que estan en funció de la diferència entre el període del cicle i el de l'oscil·lador endogen, així com de la força, o capacitat, de sincronització que té el senyal del període extern per a compensar aquesta diferència. En cada cicle es provoca un canvi de fase de l'oscil·lació del sistema endogen en funció dels senyals periòdics externs. Només es produeix sincronització amb un període extern  $T$ , quan la diferència entre el tau i  $T$  sigui compensada per un canvi de fase diari que sigui igual a aquesta diferència (181). Per tant, un sincronitzador només serà eficaç quan el seu període estigui dins dels marges de sincronització. Si el tau de l'oscil·lador és més gran que  $T$  es produirà un avanç de fase, però si el tau és inferior a  $T$  es produirà un retard de fase. La força amb que s'acoblen l'oscil·lador i el sincronitzador depèn de la força del sincronitzador i de la sensibilitat de l'oscil·lador a aquest

sincronitzador. Quan l'acoblament és fort, la sincronització és ràpida i es podrà dur a terme dins d'uns marges més amplis que si l'acoblament fos més feble.

Per tal de conèixer la sincronització que pot produir un cert fenomen extern en el sistema oscil·lador d'un individu, s'ha ideat la corba de fases de resposta (CFR),

que consisteix a fer aparèixer per temps molt curts aquest fenomen a diferents moments del ritme d'un individu en condicions constants, per tal de veure en quin moment del ritme la fase varia més. Per exemple si es vol estudiar l'efecte de la llum sobre el ritme d'un animal, es deixa l'animal en condicions de fosc constant i es van administrant polsos de llum a diferents moments del ritme (177, 52). La relació entre el moment del dia subjectiu de l'animal en què s'ha aplicat un pols de llum i el canvi de fase obtingut es pot graficar, obtenint-se així la corba de fases de resposta.

Els trets més importants de la CFR són iguals tant per a espècies nocturnes com diürnes. Aquests són: 1) la resposta a la llum es dona a la nit subjectiva. 2) En el temps en què un animal està normalment exposat a la llum (migdia subjectiu), la llum no té efectes sobre el sistema circadiari. 3) El retard de fase més gran es produeix al principi de la nit subjectiva i l'avang més llarg de fase al final de la nit subjectiva.

Cal tenir en compte que en mesurar un ritme determinat d'un animal, el que es detecta no és exactament el seu propi ritme intern, sinó que el que es detecta és el resultat de la interacció entre l'oscil·lació intrínseca deguda als propis oscil·ladors i a les influències externes. Es pot dir que un ritme consta d'uns components passius que serien les influències exògenes i d'uns components actius que són els oscil·ladors endògens. Quan interaccionen els dos tipus de components té lloc el ritme manifest, "overt rhythm", que és el que s'observa.

#### 1.4.2.1. Principals oscil·ladors

La gran majoria de ritmes dels organismes sincronitzen amb el cicle de llum-foscor. Altres factors ambientals rítmics que també poden actuar com a sincronitzadors són:

##### 1.4.2.1.1 **Cicle d'accés al menjar.**

La capacitat de sincronització d'aquest ritme en animals de laboratori va ser primerament demostrada per Richter (202), en trobar que en condicions de foscor constant l'accés al menjar un cop al dia sincronitzava el patró d'activitat motora de les rates.

En micos mantinguts en LL, s'ha trobat que cicles d'accés al menjar de 3:21 hores modificaven la fase del ritme d'activitat, de temperatura corporal i de la excreció d'aigua i d'electròlits per l'orina (235). De tota manera els resultats no són gaire clars pel fet que no es pot distingir gaire bé si els efectes del cicle de menjar són realment deguts a fenòmens de sincronització o bé al fenomen d'emascarament que serà comentat posteriorment. En rates s'ha trobat que sincronitzen amb els cicles de menjar i els ritmes de beguda (25), de corticosterona en plasma (243) i de temperatura corporal (251).

##### 1.4.2.1.2. **Camps magnètics.**

S'ha trobat que els camps magnètics artificials afecten la síntesi de melatonina a la pineal de rata durant la nit i afecta també a la retina (37). La pineal d'ocells varia en resposta als camps magnètics segons estigui "in vivo" o "in vitro". En el primer cas, sobre l'activitat dels enzims Hidroxiindol-o-metil transferasa i N-acetil transferasa, afecten descensos d'un 50% del camp magnètic mentre que, "in vitro", li afecten els increments. En els humans la imposició d'un



ritme de 11.75:11.75 hores de camp magnètic en individus en curs lliure feia sincronitzar els ritmes circadianis a un període de 23.5 hores (267).

#### 1.4.2.1.3. Temperatura.

La temperatura ambiental només afecta a organismes no termoregulats. Entre els animals homeotermes no s'ha trobat sincronització ni en rosegadors (233) ni en certs tipus de primats (235), tot i que els canvis de temperatura poden provocar alteracions d'alguns paràmetres com l'activitat motora. S'ha postulat que la uniformitat dels rellotges biològics pugui estar relacionada amb els mecanismes que compensen els canvis de temperatura ambientals (77).

#### 1.4.2.1.4. Contactes socials.

No es coneix la naturalesa exacta d'aquest tipus de sincronització. Es pressuposa que pugui ser deguda a sorolls o bé a l'acció de feromones. En els humans aquest és el sincronitzador més important. Quan un grup de persones s'aïllen juntes, encara que estiguin sense referències temporals, tendeixen a sincronitzar entre elles. En els animals, els primers estudis sobre la sincronització social son deguts a Halberg (95) que va observar com ratolins cecs sincronitzaven el seu ritme d'acidòfils a la sang amb el d'altres ratolins normals dins de la mateixa habitació. En treure els ratolins intactes de l'habitació, el ritme dels ratolins cecs desapareixia. Altres experiments mostren com els llangardaixos sincronitzen la seva activitat de manera que l'animal dominant estigui actiu a diferents hores del dia que els animals subordinats (191). D'una manera semblant, s'ha trobat com els ratolins subordinats d'una mateixa gàbia eviten el contacte amb els dominants estant actius a diferents hores de la nit (38). S'ha vist també que les femelles de rosegadors sincronitzen el cicle d'ovulació entre femelles que viuen a la mateixa gàbia (143). També moltes espècies en estat natural sincronitzen el període d'ovulació, època de zel i parts (27,270), ja que suposa molts

avantatges en la vida de la col·lectivitat. En molts altres ritmes de rosegadors no s'ha trobat sincronització social, per exemple el ritme de corticosterona adrenal dels ratolins cecs no és sincronitzat per animals intactes ni que estiguin vivint junts en la mateixa gàbia (243,246).

#### 1.4.2.1.5. Cicles de llum.

El cicle de llum és el sincronitzador més important per la majoria d'organismes. En el seu estudi cal considerar dos fets, per una banda, l'efecte que té la llum per ella mateixa sobre els ritmes; i per l'altra, l'efecte del cicle de llum sobre els altres ritmes.

La sincronització del sistema circadiari al cicle de llum-fosc es produeix a través del tracte retinohipotalàmic (RHT) que va de la retina al nuclisupraquiasmàtic (NSQ). Estudis amb hámsters mostren que el RHT no és l'única via de sincronització a la llum. Lesions en el nucli geniculat lateral no interfereixen amb la sincronització normal, però hámsters amb lesions en aquest nucli canvien de fase més lentament que els controls quan es reverteix el cicle a fosc-llum (283). Lesions en el tracte òptic accessori, al cantó posterior del quiasma, causen canvis en la sincronització i canvis de fase i d'activitat en curs lliure en els hámsters (209,210,212).

##### 1.4.2.1.5.1. Efectes de la llum.

La capacitat de sincronització de la llum depèn de la longitud d'ona de les radiacions. S'ha vist com les longituds d'ona de l'espectre de llum blanca que tenen més capacitat de sincronització són les corresponents a les bandes blava i verda, mentre que les que en tenen menys són la vermella i la ultraviolada.

La llum, per si sola, té efecte sobre l'aparició de ritmes en els organismes. Els canvis estacionals, concretament les diferents llargades del dia, regulen

l'estat del sistema reproductor (254). En els hámsters (176) fotoperíodes inferiors a 12.5 hores de llum en un cicle de 24 hores produeixen una resposta neuroendocrina que provoca una regressió gonadal a les 8-10 setmanes. Aquesta resposta no es manifesta en animals pinealectomitzats pel que es pressuposa que és una resposta mitjançada per la pineal.

Igualment, els cicles de llum-foscor sincronitzen fortament el ritme d'ovulació de la rata (110). El fotoperíode no és essencial per a mantenir el cicle de l'estre, ja que s'han descrit ritmes d'ovulació i vaginals en rates cegues i mantingudes en LL. En rates mantingudes sota cicles de llum de 12:12 hores el cicle de l'estre és de 4 dies, mentre que sota cicles de 12L:12F o de 16L:8F, el cicle té una durada de 5 dies. S'ha descrit que quan les rates estan sota un patró d'il.luminació constant es produeix, en el primer cicle de l'estre, un retard en l'ovulació i més tard una anovulació persistent amb cornificació vaginal, de resultes de la constant secreció d'estrògens (101). Aquesta anovulació s'ha trobat també en rates exposades a cicles de llum irregulars. No obstant això, si les rates sempre han estat en LL el cicle d'ovulació es manté permetent-se la reproducció. En aquest cas l'estre persistent apareix al cap de molts mesos (248). L'estre persistent en LL succeeix juntament amb la pèrdua de ritmicitats circadiàries (136) i sembla se que en aquest fet hi estan implicades les neurones retinals dopaminèrgiques (229). Alguns autors han proposat com a causa d'aquesta arritmicitat el fet que en condicions de LL un gran nombre de sinapsis del NSQ es tornen inhibidores, al mateix temps que es produeix una degeneració dels bastons de la retina en rosegadors (85, 268).

#### 1.4.2.1.5.2. Efectes de la llum constant sobre els ritmes.

En condicions de llum constant, el tau d'alguns ritmes augmenta de manera proporcional al nivell d'il.luminació (251). Els mateixos autors han trobat

que el ritme circadiari de la conducta d'autoestimulació cerebral de les rates, augmenta de període en funció del nivell d'il·luminació, anant des d'un tau de 24.10 hores en FF, fins a un tau de 25.90 hores en LL a 440 lux. Les condicions de llum constant a llarg termini fan disminuir la potència del component circadiari. Igualment l'espectre de potències és més alt en LF que en LL on la potència disminueix en funció de la intensitat de llum. Una altra diferència causada pel patró d'il·luminació és respecte als ritmes ultradiaris, ja que en LF la majoria dels components són harmònics derivats de l'harmònic fonamental, mentre que en LL i FF les relacions de freqüències són relativament variables i els harmònics ultradiaris són més importants.

En condicions de LL també s'ha trobat com els ritmes circadiaris es dissocien en diferents components d'activitat donant lloc al fenomen de la dissociació o "splitting".

L'efecte de la intensitat de la llum sobre el tau, va ser primerament estudiat per Johnson (115), però no va ser reconegut fins que Aschoff el va estudiar sistemàticament tant en espècies nocturnes com diürnes i tant en els rosegadors com en els ocells (9). Així, es van formular tres principis coneguts com a regles d'Aschoff: 1) La primera regla postula com la intensitat de la llum escurça el tau en individus diürns i l'allarga en els nocturns. 2) sota més intensitat de llum, el temps en que un animal és actiu, comparat amb el temps en que reposa, s'incrementa en espècies diürnes però disminueix en nocturns. Igualment, en espècies diürnes la quantitat total d'activitat incrementa amb la intensitat de la llum, succeint a l'inrevés en animals nocturns. 3) Per últim, es proposa que per a espècies diürnes el tau és més llarg en fosc constant que en il·luminació constant, i a l'inrevés, per a espècies nocturnes el tau és més llarg en LL que en DD. La majoria dels éssers vius segueixen les tres regles d'Aschoff tot i que s'han trobat excepcions, sobretot en mamífers diürns. Els

efectes de la llum brillant sobre el tau poden ser alterats, en els ratolins, per diferències genètiques (188).

Tal com s'ha comentat anteriorment, una manera d'estudiar la resposta de l'oscil·lador circadiari endogen a la llum és mitjançant la corba de fases de resposta. Aquesta permet quantificar la resposta de sincronització (canvis de fase) d'un ritme circadiari a un pols de llum aplicat en diferents temps durant el cicle circadiari de l'animal (154, 239).

Resumint els efectes de la llum en el sistema circadiari, es pot dir que la llum:

- 1) Afecta la sensibilitat dels oscil·ladors dels mamífers de manera diferent segons la fase del cicle, tal com es reflecteix a la corba de fases de resposta.
- 2) Afecta el tau, que varia segons la intensitat de la llum.
- 3) Produeix fenòmens de "splitting" i desincronització interna.
- 4) Quan els animals estan sotmesos a condicions prolongades de LL es produeixen efectes negatius sobre la fisiologia de l'animal com són l'aparició d'estre permanent (73), dany retinal (165) i inhibició de l'activitat enzimàtica de la pineal (16).

#### 1.4.2.2. Emmascarament o "masking".

En l'estudi dels diferents sincronitzadors, cal tenir present el fenomen d'emascarament d'un ritme o "masking", que pot ser fàcilment confós amb el de sincronització. Aquest fenomen es refereix a l'acció d'agents que afecten l'amplitud, el mesor i/o la forma d'ona d'un ritme circadiari, però que no sincronitzen el mecanisme dels oscil·ladors endògens que el

dirigeixen (9,13). Una acció d'emascarament pot produir respostes fase-depenents en un ritme manifest, però no és capaç de posar a l'hora l'oscil·lador.

El cicle de llum-fosc produueix tant accions de masking com de sincronització en els ritmes circadianis de molts vertebrats. S'ha observat que en els micos, l'acció dels cicles de llum té efecte sobre els ritmes de temperatura i activitat (79). Així, cicles de 4 hores de llum, que són massa curts per sincronitzar cap ritme, tenen un efecte en la distribució temporal d'activitat i en la variació de temperatura, tot i que els efectes són més grans sobre l'activitat. En aquests animals tant l'activitat com la temperatura augmenten just després del pas de fosc a llum i disminueixen després del pas de llum a fosc. La magnitud d'aquestes respostes sembla ser que depèn de la fase en què es trobi el propi ritme circadiari de l'animal.

Les respostes de emascarament varien molt entre espècies, molt més que altres característiques dels ritmes circadianis que reflecteixen les propietats fonamentals del sistema endogen, com per exemple, la corba de fase de resposta. Les respostes de "masking" serveixen per adequar la sortida del sistema circadiari a les necessitats específiques de cada espècie (79).

L'efecte de l'emascarament d'un ritme és important de ser tingut en compte, ja que si té efecte en la forma de l'ona també el tindrà sobre les estimacions específiques de la fase i la forma d'aquest ritme. Si l'agent causant de l'emascarament és també periòdic, la seva periodicitat es reflectirà en el ritme i podrà arribar a dominar, en el ritme manifest, per sobre de les altres periodicitats imposades pel sistema circadiari endògen. Aquest fet pot induir a errors en la interpretació del funcionament del sistema circadiari.

Tant l'emascarament com la sincronització van mitjançats per diferents rutes visuals, ja que la destrucció del nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem en

els micos, que elimina el ritme de beguda i la seva sincronització a cicles de llum-fosc, no elimina l'acció d'emascament que té la llum sobre el mateix ritme (76,77).

#### 1.4.3. CARACTER HEREDITARI DELS RITMES.

Tot i que hi ha influències ambientals sobre l'aparició i caracterització del ritme manifest, aquestes són de molt poca importància comparades amb la programació genètica del sistema circadiari. Sembla ser (43) que si bé en un principi els ritmes circadianis van sorgir com a resposta al medi ambient, ara són fixats genèticament en la majoria dels organismes.

La naturalesa hereditària dels ritmes circadianis, ja va ser demostrada per Bünning en plantes i insectes (30,31) en veure que aquests organismes seguien presentant ritmicitats circadianes encara que els seus progenitors haguessin estat mantinguts en condicions constants. Igualment es va observar com dues espècies de plantes de diferent període, en ser creuades entre elles, la generació filla presentava un període en curs lliure híbrid entre les dues, segons les lleis de Mendel, la qual cosa demostrava la naturalesa hereditària del tau.

Per tal d'estudiar les bases cel·lulars dels rellotges circadianis s'han emprat diverses tècniques genètiques. En els sistemes més senzills, com en la Drosophilla melanogaster o en la Neurospora crassa, la dissecció genètica del sistema circadiari, mitjançant una anàlisi mutacional, ha produït mutacions senzilles, les quals influeixen en les característiques de diferents ritmes circadianis simultàniament. Per exemple, aïllant 4 mutants de Neurospora crassa (80) i observant el període del ritme circadiari de conidiació s'observa com aquest ritme presenta un període diferent per a cada mutant i diferent al del tipus salvatge.

Igualment, es van aïllar tres mutants de Drosophilla melanogaster (130) obtinguts amb un mutant químic, el etilmetansulfonat, i es va estudiar el tau de cada mutant. Un mutant va resultar ser arítmic, un altre va presentar un tau de 19 hores i el tercer de 28 hores. Això implicava que els gens afectats influïen en el ritme d'eclosió pupal i d'activitat. Els tres mutants eren derivats d'una soca salvatge de tau de 24 hores. Cada mutació va ser localitzada a nivell de gens i es va veure que totes estaven localitzades en el mateix locus del cromosoma X. Aquest experiment indica l'existència d'un gen específic pel sistema regulador de temps. Igualment ha estat possible la identificació de proteïnes i estructures biològiques sintetitzades per aquests gens (131).

En els mamífers són notables els treballs de Possidente (186, 187) en estudiar els ritmes d'activitat motora de ratolins albins i pigmentats. Aquest autor ha proposat que ja que la manifestació dels ritmes depèn del NSQ i del sistema visual de sincronització, les mutacions que modifiquen els pigments retinals i les rutes visuals han de poder modificar el desenvolupament de diferents propietats dels ritmes. Va veure que els ratolins albins, que presenten connexions neurals anormals en els sistemes visuals (86), tenen un tau inferior als pigmentats. Aquest fet indica que les diferències genètiques en els ritmes circadianis poden ser degudes a diferències en el sistema visual, que ja està genèticament imposat. No obstant això, els mateixos autors han postulat que les diferències poden ser degudes a que els ratolins albins, a causa de la manca de pigments retinals, reben més llum que els pigmentats i al influir la llum sobre el tau dels ritmes es presentarien ritmicitats diferents.

Quan al ritme d'activitat s'ha observat (65) que 4 soques diferents de ratolins presenten diferències pel que fa als patrons dels ritmes. Dues soques presenten un ritme estable i en les altres dues hi ha dos patrons diferents: l'un amb activitat motora elevada i uns



inicis del ritme marcats, l'altre, amb començaments i finals confusos. Estudis posteriors sobre la forma o patró del ritme d'activitat en rates de laboratori (32) mostren diferències en el patró del ritme de les rates mantingudes en cicles de llum-fosc. En fosc constant els animals presenten diferències entre soques quan al tau, en canvi, en llum constant, en torna a haver quan al patró. Així, en LL 2 soques presenten un caràcter més ultradiari, una altra, una corba bimodal ( $\tau=12$  hores) i l'altra una corba amb tau de 4.8 hores, el que correspon a una corba de 3 pics en la fase de fosc.

També en els ratolins es mostra com el ritme de temperatura corporal de dues soques de ratolins, analitzat pel mètode del cosinor, presenta un caràcter hereditari pel que fa a l'amplitud i l'acrofase (138).

Quan a persones, Kripke (134) va proposar que les alteracions dels ritmes en els humans, per exemple en maníac-depressius que presenten un avanç de fase i un patró anormal del ritme de temperatura corporal, podien ser degudes a una predisposició genètica.

## 1.5. ESTRUCTURA DEL SISTEMA CIRCADIARI.

### 1.5.1. OSCIL·LADORS.

Tal com s'ha comentat anteriorment, els ritmes continuen manifestant-se encara que les condicions ambientals restin constants. L'existència d'un ritme en curs lliure és evidència d'un ritme endogen que ve regulat per un oscil·lador intern de l'organisme. Tot i que la bioritmicitat es considera com la propietat fonamental fins i tot d'una cèl·lula sola, es pressuposa que en el substracte neural ha d'haver-hi algunes estructures que generin els ritmes i altres que permetin la sincronització d'aquests ritmes amb el medi extern. La localització d'aquestes estructures ha estat, i és encara, una de les grans qüestions sobre la

fisiologia del sistema circadiari.

Una de les maneres d'estudi ha estat mitjançant tècniques quirúrgiques. Lesionant diferents parts del cervell i altres òrgans s'observen les conseqüències que es produeixen sobre la manifestació dels diferents ritmes. En un principi es va pensar que el sistema circadiari depenia del sistema endocrí. Richter (204), intentant eliminar els ritmes circadianis de rates mitjançant operacions, tant en el sistema endocrí com en el nerviós, va indicar que l'únic lloc que destruït eliminava els ritmes era la zona ventral de l'hipotàlem. Més tard es va demostrar com en aquesta zona es troba el nucli supraquiasmàtic (NSQ) que actualment es considera que té un paper principal en la generació i sincronització dels ritmes en els mamífers, encara que no es pugui descartar el paper d'altres estructures. En animals no mamífers és la glàndula pineal la que té un paper important en la generació de ritmes. Cal destacar que tant el NSQ de l'hipotàlem com la pineal, que està en la regió epitalàmica del diencèfal, pertanyen a la regió del cervell filogenèticament més antiga, cosa que suggereix la necessitat dels organismes de desenvolupar ben aviat un sistema circadiari.

#### 1.5.1.1. Nuclis supraquiasmàtics

Hi ha gran evidència que els NSQ són oscil·ladors circadianis en els mamífers. Els fets que ho mostren, i que s'aniran comentant posteriorment, són els següents:

- 1) L'eliminació quirúrgica del NSQ provoca pèrdua de moltes de les ritmicitats circadianes dels organismes.
- 2) Amb estudis electrofisiològics s'ha vist que les neurones del NSQ segueixen un ritme circadiari, i que aquest es manté encara que el NSQ s'hagi aïllat de la resta d'estructures cerebrals.

3) El NSQ presenta un ritme d'activitat metabòlica que es desenvolupa prenatalment, sense que la mare intervingui en aquest procés.

4) L'estimulació elèctrica del NSQ provoca alteracions de la fase i el tau de ritmes circadianis de la rata i del hámster.

#### 1.5.1.1.1. Anatomia del NSQ.

Els NSQ són un parell de nuclis ovoides situats a la base del tercer ventricle de l'hipotàlem anterior i dorsalment al quiasma òptic. Els somes de les neurones del NSQ són més petits i estan més agrupats que en altres zones del cervell; tenen unes estructures de membrana diferents de funció desconeguda (88). Les principals aferències al nucli són des del rafe, que és responsable dels elevats nivells de serotonina que es troba al NSQ (213), des del nucli geniculat lateral per via del tracte òptic o per via del lemnisc mitjà (201) i des de la retina, formant-se el tracte retinohipotàlmic (TRH) (152), que es suposa que té un paper important a la influència de la llum sobre el sistema circadiani (149). Aquest tracte ja està format als 2-4 dies de vida en les rates i en els rosegadors en general, sembla ser que és suficient per a sincronitzar la llum (211). El NSQ està format per una colla d'oscil·ladors determinats genèticament que és mantenen acoblats i interconnectats formant com una xarxa, fins i tot abans que les sinapsis del NSQ s'hagin format totalment. En les rates i els hámsters, la neurogènesi del NSQ està ben establerta abans del naixement (39), mentre que la sinaptogènesi i innervació retinal es produeixen postnatalment (140). Segons això, el desenvolupament del NSQ no és necessari per a la generació i sincronització d'oscil·lacions circadianes ja que la sincronització amb la mare es produeix ja dins de l'úter (47,48).

Estudiant la bioquímica de les neurones del NSQ, sembla ser que en aquestes hi ha varis tipus de neurotransmissors tals com neuropèptids ( vasopressina,

somatostatina o el polipèptid intestinal vasoactiu), encefalines, acetilcolina, noradrenalina i serotonina (231).

#### 1.5.1.1.2. Fisiologia del NSQ

Les neurones del NSQ presenten una activitat espontània que fluctua segons un ritme circadiari. Aquest ritme, que pot mesurar-se pel consum de glucosa (75, 218), es desenvolupa ja en període prenatal i es manifesta clarament al primer o segon dia després del naixement (199,200). La ritmicitat del NSQ persisteix després de l'aïllament del nucli de les altres aferències del cervell (112) i es manté en absència de referències externes de llum (FF) (219). Igualment, s'han trobat ritmes "in vitro" del NSQ. Mitjançant tècniques "in vitro" registrant l'activitat neuronal del NSQ en talls d'hipotàlem de rata s'ha vist com el NSQ desenvolupa l'activitat circadiària a partir del dia 14 d'edat (222). L'abolició del NSQ suposa la pèrdua d'una gran part de les ritmicitats de l'organisme, tot i que moltes vegades més que d'aritmicitat es pot parlar de manifestacions de ritmes ultradiaris (256). L'eliminació del NSQ implica la pèrdua de ritmes circadiaris de neurotransmissors cerebrals, mantenint-se ritmes ultradiaris (117). El NSQ regula també els ritmes de corticosterona en el plasma (151), d'activitat de l'enzim de la pineal N-acetil transferasa (NAT) (127), de temperatura corporal (210), d'activitat motora, cicle de l'estre i beguda en rata (232, 256).

El ritme del NSQ es manifesta en les cries sense necessitat d'influències maternes. S'ha vist com rates prenyades arítmiques, amb el NSQ lesionat, presenten fetus amb un ritme circadiari de metabolisme del NSQ, sent aquest ritme independent de les condicions externes (149, 150).

El NSQ regula també diferents ritmes circadiaris de neurotransmissors en el cervell de la rata i ritmes en el nombre de receptors alfa i beta adrenèrgics, de

dopamina, opiàcis i de benzodiazepina (118). S'ha vist (49) que en lesionar el NSQ, el tau dels ritmes que regeix, es correlaciona amb el grau de destrucció del NSQ sense tenir en compte la unilateralitat o la distribució temporal de la lesió. Aquest fet indica que el teixit del NSQ és homogeni quan a la seva contribució a la ritmicitat, tot i que hi ha dades que apunten cap a un heterogeneïtat entre els dos nuclis en les rates, tant anatomicament com fisiològica (33).

Estudis posteriors han demostrat que el NSQ no pot ser l'únic oscil·lador en el sistema circadiari de mamífers. S'ha comprovat com micos amb el NSQ lesionat presenten aritmia en el cicle d'activitat-repòs, però no en el de temperatura corporal (76). En general, en primats, les lesions del NSQ només afecten a la manifestació d'alguns ritmes, com el de melatonina, el de beguda i el d'activitat; però el que succeeix es que deixen als animals més sensibles a alteracions ambientals. En els rosegadors, el ritme de menjar perdura després de la destrucció del NSQ (25). Pel fet que després de lesions en el NSQ apareguessin periodicitats ultradiàries en alguns ritmes, es va pensar que aquestes podrien ser degudes a un oscil·lador ultradiari o bé a que hi haguessin alguns oscil·ladors circadianis acoblats (208, 210). Aquests fets indicarien que fora del NSQ ha d'haver-hi altres oscil·ladors.

Alguns autors han descrit com els dos nuclis poden funcionar independentment. Sembla ser que cada un dels nuclis actua com a un únic oscil·lador, però que està unit a l'altre a través de múltiples interaccions (174, 175).

El cicle de l'estre de les rates també ve regulat pel NSQ. S'ha demostrat que encara que la manifestació d'aquest ritme es de 4 dies, la seva organització es circadiana. Aquest fet s'ha comprovat ja que si s'allarga el cicle de l'estre, bé espontàniament o bé per injecció d'algun fàrmac, tipus pentobarbital, el cicle es retarda per un sol dia i no pels 4 dies, la

qual cosa implica que els estímuls neurogènics per a l'ovulació es succeeixen a intervals de 24 hores (34).

#### 1.5.1.2. GLANDULA PINEAL.

La glàndula pineal té un paper principal en l'organització circadiària de peixos, anfibis, rèptils (254a) i ocells (244). En els mamífers no s'ha trobat evidència de la seva importància com a oscil·lador principal, si bé és el component principal en la regulació de les respostes fotoperiòdiques (66, 254).

La pineal de peixos, anfibis i rèptils es fotosensible, així, la pineal de granotes és similar als cons de la retina, per això, es va anomenar la pineal com a tercer ull. En decurs de l'evolució la pineal ha passat de ser un òrgan fotosensitiu i endocrí, a ser només un òrgan endocrí. En mamífers no hi ha evidències neurofisiològiques de la fotorecepció.

En mamífers, el paper de la pineal és el de convertir impulsos neuronals (alliberament de NE de les neurones simpàtiques) en hormonals. La pineal actua com a un transductor que rep la informació sobre la llargada del dia des d'un oscil·lador circadiari, que pot ser el NSQ, i transmet la informació al sistema reproductor mitjançant la secreció de l'hormona melatonina. S'han trobat receptors de melatonina a l'hipotàlem i concretament, dins del NSQ (84).

La síntesi de melatonina es fa a partir de la serotonina en dos passos: el primer, per acció de l'enzim N-acetil transferasa (NAT), en el que es forma la 5-acetil serotonina. El segon pas a través de l'enzim hidroxindol ortometil transferasa (HIQMT) pel qual es forma, ja la melatonina.

L'activitat de la NAT és cíclica presentant valors més elevats a la nit que al dia. Aquest ritme circadiari es

manté en condicions de foscor constant i desapareix en condicions d'il·luminació constant (128). D'altra banda l'activitat de la HIOMT es practica constant al llarg del dia, encara que s'han descrit ritmes setmanals d'aquest enzim (277). Per tant l'activitat rítmica de la NAT es la que implica un ritme en la síntesi de melatonina. En els rosegadors, el ritme circadiari de la NAT es suposa que ve regulat pel NSQ, que allibera norepinefrina de les neurones cervicals superiors i estimula els beta receptors existents a la pineal (28). L'alliberació de norepinefrina segueix també un ritme circadiari. En foscor, l'activitat de les neurones simpàtiques pineals augmenta, a causa de que s'allibera NE en més quantitat i per tant es secreta més melatonina.

La pineal d'aus (pollastres) i rèptils (llangardaixos), al contrari del que succeeix en els mamífers, és un oscil·lador independent capaç de produir el ritme de la NAT "in vitro" (19,20).

En les rates, l'activitat de la pineal ve afectada per l'stress. Les rates stressades tenen uns nivells de melatonina molt més elevats, fins i tot en fase de llum. Per a l'estudi del ritme de la pineal és millor utilitzar l'activitat de la NAT que no els nivells de melatonina, ja que el ritme de la NAT no és afectat ni pel menjar ni per l'stress (55,56,153).

La pinealectomia produeix diferents alteracions segons les espècies. En llangardaixos la pinealectomia produeix canvis del tau en LL o bé aritmicitat. En alguns tipus d'ocells (*Padda cryzivorai* *Sturnus vulgaris*), es produeix l'eliminació del ritme circadiari en curs lliure de locomoció i temperatura corporal (64,91). Un trasplantament de la pineal pot fer reestablir la ritmicitat circadiària d'activitat motora (280). A més, s'ha demostrat que la fase dels ritmes d'activitat en els ocells es pot influir trasplantant pineals d'altres ocells que hagin viscut sota diferents fotoperíodes. En els pardals, *Passer domesticus*, la pineal es necessària per a la

persistència de la gran majoria dels seus ritmes ( ). La pineal d'aquesta espècie també manifesta ritmicitats "in vitro" (19,56).

En els mamífers, concretament en rates, la pinealectomia produeix alteracions quan als nivells en el plasma de diferents hormones i altera la fase dels ritmes (78). Els animals pinealectomitzats, després d'uns canvis de fase en el ritme de LF, poden resincronitzar el seu ritme d'activitat més ràpid que les rates control (189a), cosa que implica que el mecanisme de sincronització ve influït per la pineal. Els animals pinealectomitzats es diferencien dels normals en la forma o amplitud de la corba de fases de respostes. La producció de melatonina varia amb l'edat i s'ha trobat que la pinealectomia produeix els mateixos efectes sobre el ritme de corticosterona en animals joves, que els que es produeixen als dos anys d'edat (171)

En els mamífers, a causa de la pinealectomia es produeixen també efectes sobre el sistema reproductor. Aquest efecte, sembla ser causat per l'activitat antigonal de la pineal que ve regulada per impulsos provinents del NSQ.

La llum afecta el ritme de la pineal ja que fa disminuir l'activitat de la NAT, fent decreixer la producció de melatonina. Les rates que es tornen arítmiques en LL poden sincronitzar el ritme amb injeccions diàries de melatonina. Els efectes conductuals de la melatonina depenen de que el ritme circadiari i el NSQ estiguin intactes (36).

#### 1.5.1.3. Altres oscil.ladors.

Si el NSQ és el principal oscil.lador en els mamífers, les altres estructures que actuen com a possibles oscil.ladors hauran d'estar acoblades amb ell per tal d'assegurar la sincronització normal del sistema



circadiari. Amb aquest criteri i la determinació dels ritmes que regeixen, s'han proposat com a oscil·ladors les següents estructures:

#### 1.5.1.3.1. Nucli ventromedial de l'hipotàlem (VMH)

Es considera al VMH responsable de la sincronització al cicle de menjar que s'observa en la rata després de la destrucció del NSQ. L'activitat del VMH ve influïda per la ingesta de nutrients (221) i pels nivells en el plasma de glucosa, àcids grassos lliures i insulina. El ritme del VMH és eliminat per lesions en el NSQ, però no succeeix a l'inrevés, això prova que el NSQ domina per sobre del VMH (111).

#### 1.5.1.3.2. Nucli arcuat (NA)

El NA és important per a la generació i manteniment del ritme de l'hormona del creixement (GH) i per a la sincronització d'aquest ritme. Lesions en el NA produeixen un descens en la magnitud de la secreció de GH (146).

#### 1.5.1.3.3. Nucli geniculat lateral (NGL)

Lesions en el NGL retarden la sincronització a canvis de fase de 12 hores del cicle de LF. Rates amb el NGL lesionat triguen més a sincronitzar el ritme de beguda a canvis de fase del cicle LF que els animals normals (283).

#### 1.5.1.3.4. Rafe

Lesions electrolítiques en el nucli mig del rafe disminueixen l'amplitud i el mesor del ritme de l'hormona LH (98) i de ritmes sincronitzats amb l'ACTH (240), però no tenen efecte sobre els ritmes de corticosterona i activitat.

### 1.5.2. EVIDENCIA DE MULTIPLES OSCIL.LADORS.

A part de la localització de les estructures responsables de les ritmicitats circadiàries en els organismes superiors, és important arribar a trobar quina és la manera en què aquestes s'organitzen. En aquest aspecte han sorgit diverses qüestions. La primera ha estat trobar si hi ha un o uns quants oscil.ladors per a la regulació dels ritmes en els organismes, i en el cas de ser uns quants si aquests estan organitzats jeràrquicament o no. L'altre qüestió ha estat com els oscil.ladors poden generar els ritmes circadiaris i acoblar-los entre ells i les condicions ambientals.

Diferents fets han fet pensar que els sistema circadiari està constituït per uns quants oscil.ladors funcionant de manera acoblada. Els principals fets han estat els fenòmens de dissociació o "splitting" i la dessincronització entre ritmes, tots dos observats en condicions constants.

#### 1.5.2.1. Dissociació o "splittint".

La dissociació dels ritmes és una de les primeres indicacions de l'existència de múltiples, i possiblement independents, oscil.ladors. Aquest fenomen, que apareix de manera espontània quan un animal es deixat en condicions d'il.luminació constant, consisteix en que la fase d'activitat diària d'un ritme es dissocia en 2 o més components o pics d'activitat. Cada component té el seu propi període, tau. En hamsters s'han descrit tres tipus de dissociacions (178). Un, el més freqüent, en el que hi ha dos components de tau semblant que mantenen una relació de fase de 180 graus. Un altre presenta dos components de diferent tau sense relació de fase estable, i un tercer tipus presenta un patró arítmic del que al cap d'un temps sorgeixen dos components que al final s'ajunten formant un ritme únic en curs lliure.

La dissociació s'ha observat tant en animals diürns com

nocturns (177), sobre tot quan hi ha canvis en la intensitat d'il·luminació constant. En els rosegadors nocturns s'ha descrit després de 40-60 dies d'exposició a la llum constant (26) el primer tipus de dissociació quan als ritmes de beguda, menjar i autoestimulació elèctrica del cervell. En les mateixes rates, els components de la dissociació es refusionen en ser mantingudes en fosc constant. També s'han descrit dissociacions en el ritme de temperatura corporal dels rats penats (145) i de micos (78).

Després de lesions en el NSQ, s'ha trobat també un cert tipus de dissociació. Els hamsters lesionats mantinguts en condicions constants presenten un ritme d'activitat motora amb dos o tres pics d'activitat (209).

Sembla ser que el sistema endocrí té un paper molt important en el fenomen de la dissociació, ja que extirpacions de la glàndula pineal o de les gònades, o bé l'administració d'algunes hormones produïdes per aquests òrgans alteren el ritme circadiari d'activitat. Tant les hormones pineals com les gonadals estan implicades en l'acoblament dels oscil·ladors circadianis. Així, s'ha trobat dissociació de ritmes quan hi ha canvis en nivells hormonals. Per exemple, els estornells injectats amb testosterona, dissocien el ritme d'activitat en dos components de diferent tau (90). La dissociació s'ha relacionat amb un baix nivell d'estrògens (158).

Les bases neurals per a explicar la dissociació es troben en el NSQ. En aquest aspecte són de destacar els treballs de Pickard i cols. en 1982 (173,174,175). Aquests autors han trobat com la dissociació que normalment es produeix quan els animals estan sota condicions de llum constant és anul·lada després de la destrucció d'un sol NSQ, apareixent aleshores un ritme circadiari amb un únic pic d'activitat motora, de tau inferior al tau del ritme natural de l'animal. Si es lesionaven els dos nuclis apareixia una aritmicitat. Amb això, aquests autors han postulat com els dos nuclis supraquiasmàtics funcionen independentment i el

ritme manifest de l'animal és resultat de la interacció entre els dos NSQ. La dissociació és deguda a la interacció entre els dos NSQ quan l'individu és deixat en condicions de llum constant.

#### 1.5.2.2. DESINCRONITZACIO INTERNA.

L'altre fet que indica l'existència d'un sistema multioscillador és la dessincronització interna. Aquest fenomen pot aparèixer de manera espontània tant en l'home com en animals.

En condicions de curs lliure, ritmes que solen anar sincronitzats entre ells, com el de temperatura amb el d'activitat motora i el cicle de l'estre, o el ritme de corticosterona amb la ingesta de menjar, es desincronitzen, és a dir, cada ritme segueix el seu propi període i fase independentment dels altres. Per exemple, en micos (236) els ritmes de menjar, beguda i temperatura desincronitzen dels de concentració de potasi urinari i del de excreció d'aigua en llum constant.

Aschoff (10) va trobar desincronització entre els ritmes de activitat-repòs i el de excreció de calci per l'orina (tau de 32.6 hores) i el de temperatura i excreció de potassi i aigua per l'orina. Així es va suggerir que els ritmes d'humans venen regits per dos oscil·ladors principals. Un oscil·lador, el X, regeix els ritmes de somni REM, de temperatura corporal, de cortisol plasmàtic i de l'excreció de potasi en l'orina, mentre que l'altre manté els ritmes de son d'ona lenta, de temperatura de la pell, de la hormona del creixement en plasma i de la excreció de calci en orina (156).

El fenomen de la dessincronització interna pot aparèixer espontàniament amb l'edat en humans i d'una manera induïda degut a canvis del patró de il·luminació i a efectes de "jet lag" després d'atravesar varies zones horàries (264). És un fet curiós de constatar el que molts cassos de desincronitzacions internes han

estat observats en malalts depressius i en pacients amb intents de suïcidi (206, 262). Per aquest fet, s'ha postulat que la causa de moltes malalties psiquiàtriques té el seu origen en la desincronització dels ritmes ( ).

### 1.5.3. TEORIES SOBRE L'ESTRUCTURA DEL SISTEMA CIRCADIARI EN MAMÍFERS.

Els fenòmens de dissociació i de dessincronització interna juntament amb el fet de que els ritmes de certs òrgans es mantenen "in vitro", com per exemple les glàndules adrenals en la producció de corticosteroids (7), o cèl·lules del fetge en el consum d'oxigen (137) o en síntesi de proteïnes (96,97), suporten la teoria que diu que el sistema circadiari dels mamífers ha d'estar format per més d'un oscil·lador capaç de generar ritmes circadianis. Aquests oscil·ladors estan sincronitzats entre, ells tant si l'animal està en un entorn periòdic o no, i a més, cada un d'ells està sincronitzat amb certs cicles ambientals. Per tant cal que hi hagi uns transductors dels senyals del medi ambient a senyals biològics que sincronitzin cada oscil·lador.

En teoria, els elements que podem trobar en l'estructura del sistema circadiari són els següents (154):

- Transductors. Són els receptors que detecten canvis periòdics del medi extern i transformen els senyals de temps en senyals entenedors pels oscil·ladors primaris.
- Oscil·ladors primaris o "pacemakers". Són els oscil·ladors que mesuren el temps en absència de senyals periòdics externs. Reben informació dels canvis ambientals i donen senyals diaris a l'organisme, tant si rep o no referències temporals a través dels transductors.

- Oscil·ladors secundaris o perifèrics. Són estructures que poden oscil·lar per elles mateixes, però que normalment són sincronitzades pels mediadors i dirigeixen els ritmes manifestes de les variables fisiològiques.

- Mediadors. Són els elements que transmeten informació temporal d'una banda del cos a una altra.

- Elements passius. Són els teixits o sistemes fisiològics que no són capaços de mantenir el ritme circadiari per ells mateixos. Mostren un ritme circadiari en les seves funcions quan són dirigits per un mediador i deixen de ser rítmics quan el mediador es manté constant.

D'aquesta manera, els oscil·ladors secundaris estan normalment acoblats als primaris mitjançant mediadors i els primers acoblats als transductors per d'altres mediadors. Aquesta colla d'interaccions dona lloc a l'aparició de ritmes circadianis en els elements passius.

L'organització del sistema circadiari formant una xarxa de multioscil·ladors comporta una gran constància dels ritmes en els organismes (68), hi ha conseqüències molt significatives i avantatges selectius en una organització de multioscil·ladors (23). D'altra banda, la organització que hi ha entre tots aquests oscil·ladors és jeràrquica, estant el NSQ en posició dominant sobre els altres oscil·ladors.

Es evident, doncs, que la generació del ritme és deguda a un gran nombre d'oscil·ladors, probablement circadianis, que depenen d'interaccions mutues per estar acoblats (271). La mida de la població és crucial per a l'estabilitat de l'oscil·lació. Així, s'ha vist que el període i estabilitat del ritme integrat d'alguns oscil·ladors depèn de la mida de la població que interacciona (210). Les lesions en el NSQ poden eliminar part d'aquesta població, fent que els oscil·ladors restants no tinguin força suficient perquè

resulti un ritme circadiari integrat. En aquest cas, un impuls extern com el cicle d'il·luminació pot exercir control sobre aquest sistema i reintegrar el ritme manifest.

Tenint en compte totes les estructures que poden actuar com a oscil·ladors, un esquema de l'organització circadiària seria el següent:

En el sistema nerviós dels mamífers, i concretament l'hipotàlem, hi ha gran quantitat d'oscil·ladors circadiaris endògens, alguns dels quals estan al NSQ. El NSQ és el component principal del sistema. Genera els ritmes circadiaris i els acobla als ritmes externs a través d'un impuls visual provinent de la retina pel TRH. Degut al TRH el NSQ produeix un control de fase sobre altres oscil·ladors que no tenen accés a la informació fòtica. A part de la influència de la llum, el sistema circadiari és modificat per altres estímuls no visuals, que actuen com a sincronitzadors secundaris.

Per sota del NSQ, jeràrquicament, hi ha d'altres oscil·ladors secundaris, que en absència del NSQ mantenen alguns ritmes, com poden ser el VMH o el NGL.

També el sistema endocrí influeix en els mecanismes circadiaris, tot i que no es coneix quina és la part del sistema circadiari on pot influir (211).

## 1.6. ONTOGENIA DELS RITMES CIRCADIARIS.

L'ontogènia del sistema circadiari es refereix tant al com apareix i es va organitzant el sistema en els organismes vius i als mecanismes que regulen aquesta aparició, com a les causes i efectes de les alteracions rítmiques produïdes per l'edat.

L'aparició de les ritmicitats circadiàries és un fenomen postnatal en la gran majoria de ritmes, és a dir, des que l'individu neix ha de passar un cert temps fins que adquireix els ritmes característics de l'estat adult. En alguns casos no es pot excloure, la possibilitat que la manca de ritmicitats del període prenatal estigui relacionada amb la incapacitat per a detectar-les.

### 1.6.1. INFLUENCIA MATERNA.

En l'úter de la mare és on els fetus reben ja les primeres influències rítmiques, tant a causa de la ritmicitat pròpia de la mare, quan a l'activitat o al ritme de temperatura, com als ritmes de nutrients i hormones que travessen la placenta cap a la sang del fetus (197).

S'han realitzat diferents experiments per tal de trobar quina és la importància de la mare respecte al ritme del fetus.

Mesurant l'activitat metabòlica de la glucosa del NSQ en el fetus de la rata, s'ha vist que als 19-20 dies de la gestació, el nucli de les cries és actiu de dia i inactiu de nit (199,200). La mare sembla ser que és capaç de sincronitzar les cries al cicle de llum-fosc, mentre que les condicions de llum no afecten el fetus directament. La mare actua com a un transductor entre el fetus i les condicions ambientals, ja que sense coordinació materna els ritmes es desenvoluparien incoordinats fins que hi hagués contacte amb la llum.



La sincronització que es produeix a l'úter és molt més forta que la que es produeix per la mare després del naixement. Hámsters criats en LL presenten una sincronia entre els individus de la ventrada i la mare ja des de l'inici de la gestació (47, 48); i els angles de fase dels ritmes circadianis d'activitat motora de les cries al deslletament no estan distribuïdes a l'atzar, sinó que hi ha relació amb l'angle de fase de la mare.

Rates cries transferides als dos dies d'edat a una altra rata que actua com a mare adoptiva, mantenen la fase de la mare natural en lloc de sincronitzar-se amb la nova mare. La influència de la mare adoptiva no es notava fins als 10 dies d'edat en el ritme de NAT pineal (54). Altres autors (217), estudiant en el ritme de beguda el període crític pel qual cries cegues poden sincronitzar amb la mare adoptiva, mostren com la sincronització entre aquests animals només es produeix durant els dies 4-10 després del naixement, no havent-hi sincronització ni abans ni després. Altres estudis del ritme de la NAT pineal mostra que les rates adoptives no sincronitzen les cries, però sí que influeixen el seu ritme (55). Estudis en foscor constant (198) mostren que el ritme de la NAT pineal es molt manifest el dia 10 postnatal i està en fase amb el de la mare, en canvi, rates que durant tres setmanes des del naixement, estan vivint amb una mare adoptiva de ritme circadiani oposat al de la mare natural, presenten un ritme només endarrerit 3 hores amb el de la mare natural, aixó prova quela mare adoptiva influeix poc en la manifestació del ritme de les cries, sent molt més important la sincronització amb la pròpia mare, que te lloc a l'úter. Una conclusió semblant va ser treta estudiant la aparició dels ritmes de corticosterona en el plasma de rates cegues. Aquest ritme ve determinat per les mares naturals en el moment del naixement o abans, tot i que pot ser modificat en algunes cries per les mares adoptives (247.)

En estudis fets amb micos no s'ha trobat cap tipus de correlació entre les hormones esteroides del líquid amniòtic i els canvis d'esteroides en la sang materna o fetal (259). Takahashi (242, 243, 247) ha estudiat la influència de la mare adoptiva en els ritmes de corticosterona i NAT i va trobar que la relació de fases entre els dos ritmes es manté igual en rates cegues que intactes. El mateix autor proposa que la mare té un paper molt important en sincronitzar el ritme de les cries cegues durant les dues primeres setmanes de vida. Després el ritme ja transcorre lliurament.

Altres estudis mostren com la influència de la mare en els ritmes es dona també durant l'alletament i, fins i tot, quan les cries ja mengen.

Quan les cries de rata són aïllades de la mare i de la resta de la ventrada just en néixer sent alimentades per una cànula implantada, es produeix un retard de l'aparició del ritme circadiari d'activitat motora (228). Les rates criades amb la mare presenten evidència del ritme (diferència entre l'activitat del dia i de la nit) cap al dia 9 després del naixement, mentre que les aïllades no. No obstant això, els mateixos autors proposen que aquest fet pot tenir la causa en que les rates aïllades manifesten dèficits neurals que eviten el bon desenvolupament dels ritmes. Un altre explicació pot ser pel fet que en estar sota el ritme de LF, les rates aïllades no són capaces de respondre a la llum igual que ho fan les criades amb la mare.

D'altra banda, és un fet ben evident que la mare varii de ritme durant el desenvolupament de les cries, el que indica la possibilitat que la mare s'adapti a la ritmicitat de les cries. El que no sembla ser probable és que la sincronització entre totes les cries de la ventrada pugui modificar l'angle de fase de la mare, sinó que es la mare que produeix variacions en la fase del ritme que s'està formant de les cries.

Així com hi ha un acord sobre l'existència d'una sincronització prenatal, no hi ha una opinió generalitzada sobre la sincronització en el període postnatal. El ritme postnatal matern sembla ser un sincronitzador feble i l'acoblament entre la mare i les cries està sotmès a diferents condicions ambientals (48).

#### 1.6.2. DESENVOLUPAMENT DELS RITMES EN ELS MAMÍFERS.

##### 1.6.2.1. En els humans.

En els humans s'ha demostrat que la sincronització social té un paper molt important en la manifestació dels ritmes. No obstant això, l'aparició de les ritmicitats en els nens va més lligada a la maduresa de les capacitats fisiològiques que no pas a la sincronització. S'ha vist que els nens prematurs manifesten ritmes més tard, respecte al naixement, que els nens normals (71). Tanmateix, els nens que neixen amb alt risc presenten l'aparició d'activitats rítmiques més tardanament.

En els nadons, un dels ritmes més manifest és el de son-  
revel·la, que no apareix fins al segon més de vida (129). En estudiar aquest ritme s'observa com els períodes de son es van agrupant cap a certes hores de la nit. Tot i així, el ritme de son no és sincronitzat de manera estable amb el medi ambient fins a les 22 setmanes de vida. Altres ritmes, en canvi, apareixen més tard, tals com el ritme d'esteroides adrenals que, no apareix fins al final del segon any de vida. Els dos ritmes van madurant fins a l'adolescència, on ja presenten les ritmicitats de l'adult. La maduració del ritme acostuma a produir un increment en l'amplitud. Alguns ritmes s'han pogut detectar just en néixer, com són el ritme circadianari de temperatura de la pell, el de freqüència cardíaca i el de respiració (255).

#### 1.6.2.2. En les rates.

A l'igual que en la majoria d'organismes, hi ha dos trets generals a tenir en compte en l'estudi de l'ontogènia dels ritmes de les rates. L'un és que els diferents ritmes apareixen a diferents edats i l'altre, que la majoria dels ritmes requereixen un període de maduració fins a l'adquisició del ritme propi d'estat adult.

En les rates l'ordre d'aparició dels ritmes és el següent: primerament apareixen els ritmes associats amb el menjar, com per exemple l'increment de pes; després els ritmes de la pineal i del sistema nerviós simpàtic i els ritmes endocrins controlats per la hipòfisi; per últim apareixen ritmes en conductes voluntàries tals com la beguda i la locomoció. Les evolucions d'alguns dels ritmes més característics de la rata són:

##### 1.6.2.2.1. Desenvolupament del ritme del NSQ.

L'activitat rítmica del NSQ es desenvolupa en la rata durant el període prenatal. Aquesta activitat es pot mesurar pel metabolisme del NSQ en el consum de glucosa (218). Alguns autors han trobat que el ritme d'activitat neuronal del NSQ s'inicia entre els 11-14 dies d'edat (222), altres autors, en canvi, no el detecten fins al dia 19 de l'embrió (199). Cal tenir present que en aquestes edats el NSQ té les seves estructures poc desenvolupades i les neurones són força immadures, segons això, les neurones del NSQ es produeixen com a oscil·ladors circadianis independents, ja determinats genèticament, que es van acoblant i interconnectant durant el desenvolupament (149, 150). S'ha proposat que el NSQ oscil·la abans de poder-se mesurar els ritmes manifestats, i que, de fet, el NSQ és funcional durant tota la vida fetal, sent influït en la seva fase pel sistema circadiani de la mare.

##### 1.6.2.2.2. Ontogènia del ritme de la pineal.

El ritme de la pineal es mesura per l'activitat de

l'enzim NAT que controla la síntesi de melatonina. Aquest ritme va bé per a ser estudiat, ja que només es pot sincronitzar per un estímul ambiental, el cicle de llum-fosc (153) i no es afecta per l'estrès (127).

El ritme de la pineal és originat en el sistema nerviós central, probablement en el NSQ, i arriba a la pineal per innervació simpàtica del gangli cervical superior. L'estimulació dels receptors beta-adrenergics en la pineal, mitjançant la NE, activa un sistema adenilat ciclada que incrementa l'activitat del NAT. La sincronització del ritme de la NAT es produeix a través de la retina, pel tracte retinohipotalàmic que va directament de la retina al NSQ.

S'ha demostrat que el ritme de la pineal comença al dia 4 postnatal, quan ja està format el RHT i el NSQ, però la seva amplitud va augmentant fins al dia 10 (198). En els hàsters el ritme de la pineal en la producció de melatonina s'observa a partir del dia 17 de vida (207), encara que els continguts de melatonina nocturns són més alts que els diürns després del dia 12 d'edat. La llum, que provoca una disminució de l'activitat del NAT no té acció fins al dia 14 després del naixement.

#### 1.6.2.2.3. Desenvolupament del ritme adrenal.

El ritme de cortisol plasmàtic en les rates femelles apareix cap al dia 18 (190), però va variant en forma, amplitud i fase amb el cicle de llum fins a la pubertat. L'aparició d'aquest ritme es pot endarrerir injectant dexametasona (183,184). S'ha proposat que el sistema de serotonina pot estar envoltat en el control del ritme de corticosterona, ja que el ritme de serotonina cerebral apareix el dia 19, abans del de corticosterona que ho fa el dia 24. Altres autors (104,105) han trobat que l'oscil·lació circadiana del ritme de cortisol plasmàtic s'inicia prenatalment i que a partir del dia 10 de la gestació, ja no és necessari pels ritmes de les cries que les mares presentin ritme circadian de cortisol plasmàtic ni d'activitat motora (245,247).

Takahashi (245), estudiant el ritme adrenocortical de les rates, va trobar que el ritme circadiari adrenocortical típic, que sincronitza amb els cicles LF, queda ben establert a les 4 setmanes després del naixement, tot i que les diferències entre dia i nit quedaven ben definides a les tres setmanes d'edat. Una anàlisi espectral a les tres setmanes de vida reflecteix l'existència d'un ritme ultradiari en lloc d'un de circadiari. Els mateixos autors demostren com la llum i els ulls no són essencials pel desenvolupament del ritme adrenocortical endògen de les rates.

#### 1.6.2.2.4. Desenvolupament del ritme d'activitat motora.

En les rates, el ritme d'activitat es comença a manifestar cap al dia 10 després del naixement (228). Altres estudis fets amb ratolins, mostren com el ritme d'activitat adquireix un valor asimptòtic del contingut de potència de l'armònic circadiari cap als 21 dies, després del deslletament (60). Aquest fet mostra com encara que el ritme aparegui en edats primerenques, aquest va evolucionant i tarda un temps fins a adquirir el ritme propi de l'estat adult.

En les rates el ritme d'activitat motora varia del dia 30 al 88 després del naixement, havent estat proposat que aquesta variació és deguda a les variacions dels llocs d'unió de la dopamina (D2) per la 3h spiperona, que s'associen amb la AM durant la fase fosca (29). En els gats, s'ha observat que el desenvolupament de l'activitat motora passa per diferents fases, (141), havent-hi dos increments d'activitat, l'un a la segona setmana, relacionat amb el desenvolupament dels sistemes visuals i auditius, i l'altre, a la quarta setmana, relacionat amb la maduració dels sistemes neurals relacionats amb el control motor. .

Cal remarcar que l'organització temporal que s'observa en l'animal adult és, per una banda, una propietat que

sorgeix d'un sistema determinat genèticament i, per l'altra, ve modulada per les influències ambientals. S'ha postulat que enfront de les variacions ambientals, la característica genètica o innata té un paper molt més decisiu en la configuració del ritmes (154).

### 1.6.3. INFLUÈNCIA DE L'EDAT.

Està ben establert, encara que no es coneix exactament el mecanisme, que l'organització temporal varia amb l'edat.

En els mamífers, s'ha descrit que, en general, amb l'edat hi ha tanta pèrdua del patró circadiari de paràmetres conductuals, com pot ser l'activitat motora; com de fisiològics, com la temperatura, diverses variables citològiques, de neurotransmissors o d'hormones (109).

En els humans un dels trets més característics de la variació de patrons circadianis és la variació del ritme del son. S'observa que amb l'edat es produeix un increment de períodes del son durant el dia i interrupcions d'aquest durant la nit. Igualment, es produeix un canvi de fase en relació a l'hora de llevar-se, despertant-se més d'hora al matí. Estudiant els ritmes de temperatura i de son comparats entre un grup d'individus joves i un de vells, s'ha trobat com el grup de vells presenta una disminució del període i de l'amplitud dels dos ritmes (263).

Altres canvis que es produeixen amb l'edat són una dessincronització interna espontània entre els ritmes de temperatura corporal i el de son-revetlla (263), que segueixen en curs lliure tals diferents (10). Aquests fets impliquen que amb l'edat varia la capacitat del sistema circadiari per a mantenir l'ordre temporal, tenint l'individu menys capacitat per a adaptar-se a canvis d'horaris. No obstant això, en els humans, aquests canvis d'organització poden venir en part

influits per la pèrdua de contacte social que mantenen els individus vells, així com pel fet de perdre el regim d'horaris (265).

En les rates s'ha vist que hi ha variació, amb l'edat, en el patró del ritme de son i de la capacitat de resincronitzar el ritme de son a un canvi de llum que variï 180 graus de fase (189a).

Alguns autors han trobat que l'oscil·lador circadiari varia amb l'edat (180,181). S'ha demostrat que es produeix una disminució del període en curs lliure del ritme d'activitat motora en hámsters i ratolins, tant en el procés d'envelliment com en el pas de la pubertat a la maduresa, produint-se potser com a conseqüència del canvi, desordres interns i canvis en la relació entre l'animal i el seu entorn.

Altres autors, al contrari, han trobat com el tau del ratolí augmenta amb l'edat, quan els animals es deixen en FF. També han trobat que amb al edat els post-efectes persisteixen durant més temps i que la relació alfa/ro, que en individus joves augmenta en el temps, en els vells practicamente no varia. Aquests fets mostren una diferent plasticitat del oscil·lador circadiari, sent aquesta més gran en individus joves, els quals accepten els canvis més ràpidament.

Amb l'edat, també s'ha trobat que disminueixen les diferències genètiques existents entre dues soques de ratolins (260) produint-se un descens d'activitat i un increment en la reacció a canvis d'il·luminació. Igualment, en la rata i el ratolí, amb la edat disminueix l'amplitud dels ritmes de temperatura (279) i del ritme de consum d'oxigen (214). Altres estudis mostren pèrdues de ritmicitat en diferents períodes. Així, de 23 enzims estudiats, que segueixen un ritme circadiari en ratolins joves, només 14 d'ells són circadianis en ratolins vells (70). També s'han descrit canvis, amb l'edat, en les secrecions de diferents neurotransmissors com serotonina, norepinefrina i acetilcolina. Aquests neurotransmissors estan implicats



en la regulació de melatonina i en l'activitat hipotalàmica-adrenal (171).

D'altra banda, en rates femelles es produeix una variació del cicle de l'estre, observant-se al final del primer any de vida d'aquest cicle (160). Entre els 12 i 15 mesos d'edat es presenta un estat anovulatori d'estre constant que es manté fins als dos anys. Al final del segon any es produeix un estat amb cicles irregulars.

En general, es pot dir que amb l'edat hi ha una disminució de les funcions generals de l'organisme i una d'elles és l'organització circadiària.

#### 1.7. DIFERENCIES ENTRE SEXES.

A l'igual que en molts altres paràmetres fisiològics i conductuals, en el control, o en la manifestació dels ritmes circadianis dels individus hi ha diferències a causa del sexe. En general, es qüestiona si la diferència es per raó d'una resposta diferent del sistema circadiari enfront de l'actuació d'hormones o bé si realment és que hi ha diferències de sexe quan a estructures, siguin derivades de la estructura genètica de l'animal o bé formades en el procés de desenvolupament que influeix en l'organització circadiària.

##### 1.7.1. DIFERENCIES QUAN ALS RITMES

S'ha observat que en els hamsters hi ha diferències entre sexes del ritme d'activitat motora quan al tau, al límit de sincronització superior i a la relació de fase entre l'inici d'activitat i el cicle de sincronització (46). En les femelles el principi d'activitat es dona abans d'apagar-se la llum, mentre que en els mascles es dona després. Els mateixos autors

proposen que aquesta diferència no té res a veure ni amb la circulació d'esteroides gonadals ni amb el cicle de l'estre de les femelles, estant la diferència lligada a la pròpia fisiologia de cada sexe.

També s'han trobat diferències entre sexes, quan al patró del ritme d'activitat, en les rates, sent aquestes diferències observables més fàcilment en la fase fosca del ritme (275). Les femelles presenten un nivell d'activitat constant durant tota la fase de foscor, mentre que els mascles, en la fase fosca presenten diferents períodes d'activitat (corbes bi o trimodals), indicant que en el ritme dels mascles hi ha més components ultradiaris.

Altres experiments mostren diferències quan al metabolisme de les proteïnes cerebrals (250) i en els ritmes del factor alliberador de corticotropina (99).

A nivell de diferències sexuals en el sistema circadiari s'ha trobat que el NSQ està morfològicament diferenciat segons el sexe (282). El ritme d'activitat motora depèn de la integritat del NSQ i, probablement, el dimorfisme morfològic dels nuclis vingui reflectit en les diferències del ritme d'activitat.

S'ha proposat (282) que la diferència entre sexes en el sistema circadiari dels hámsters és induïda durant el desenvolupament en resposta a l'estimulació neonatal d'hormones.

### 1.7.2. INFLUENCIA DE LES HORMONES.

Respecte a l'actuació de les hormones sobre els ritmes, és ben evident que el sistema endocrí influeix sobre el sistema circadiari. Hámsters i rates femelles (166,249) mostren, per aquest fet, uns ritmes diaris en la funció neuroendocrina, no observables en els mascles, relacionats amb el temps d'ovulació.

El paper de les hormones es va començar a estudiar, quan es va veure que la relació de fases entre el principi d'activitat i el moment d'obrir-se les llums variava segons el dia en les femelles (254). Quan els nivells d'estrógen eren alts el començament d'activitat es produïa abans que quan els estrògens eren baixos. Igualment, nivells baixos d'estrógen van associats a un canvi en el patró d'activitat motora i a una disminució en la quantitat total d'activitat (2). S'ha descrit (282) que la implantació subcutània de benzoat d'estradiol, escurça el tau del ritme d'activitat dels hámsters femelles. D'altra banda (158), l'estradiol evita la dissociació i la dessincronosi del ritme d'activitat motora a causa de l'exposició a la llum en hámsters ovariectomitzats. Es proposa que en el sistema oscil.lador que genera el ritme circadiari manifest, l'estradiol actua facilitant la sincronització entre aquests oscil.ladors. El NSQ no té llocs d'afinitat pel binding d'estradiol, mentre que l'àrea anterior de l'hipotàlem si que en conté i en gran nombre. Aquesta regió està diferenciada entre sexes. Tot i així, no es coneix encara exactament quina és la resposta dels sistemes circadianis a l'estradiol.

Els andrògens, tant exògens com endògens, eliminen la capacitat del ritme circadiari d'activitat motora dels hámsters en respondre a l'estradiol. L'administració d'estrògens a femelles castrades escurça el tau (46). La castració de ratolins mascles produeix un increment del tau, mentre que l'administració de testosterona l'escurça. Respecte al ritme de corticosterona, les femelles presenten una amplitud mes gran que els mascles. Els mascles castrats presenten la mateixa amplitud que les femelles.

Alguns ritmes circadianis en òrgans com el fetge o ronyó són diferents segons el sexe, trobant-se que en aquests dos òrgans la femella és menys circadiària que el mascle. Aquests dos òrgans són afectats per canvis hormonalis del cicle de l'estre (253).

### 1.8. RITME D'ACTIVITAT MOTORA

En ser el ritme d'activitat motora el que s'estudiarà en aquest treball, s'ha considerat interessant el dedicar un apartat específic a aquest ritme.

El patró del ritme d'activitat motora ha estat un dels més estudiats dins del camp dels ritmes biològics. Del seu estudi deriva una gran part dels coneixements sobre el sistema circadiari dels mamífers. Cal diferenciar aquest ritme del de son-vigília, ja que repòs no es sinònim de dormir, ni activitat n'és de vigília. Els dos ritmes, en molts casos no es corresponen. El ritme d'activitat motora compleix i reuneix moltes condicions que el fan adient per a l'estudi dels oscil·ladors. Es un paràmetre que permet un registre continu durant un període de temps llarg d'un mateix individu i té l'avantatge de no estressar l'animal per manipulacions en l'obtenció de mostres. Aixó permet una estimació molt precisa dels paràmetres dels ritmes, que no s'obtidria utilitzant altres ritmes.

La rata, com a animal nocturn, és activa durant la major part de la fase de fosc i inactiva en la de llum. En aquests animals la distribució diària del ritme de son vigília correspon practicamente amb la d'activitat-repòs. La rata presenta intervals d'activitat durant tot el dia, predominantment en la fase fosca. Com qualsevol altre ritme, quan l'animal és deixat en condicions constants, el ritme d'activitat motora corre lliurement segons el període endogen dels seus oscil·ladors. S'ha demostrat que el tau de l'oscil·lador circadiari, a l'igual que la capacitat de sincronització, son paràmetres determinats genèticament (51). El tau de la rata es diferent si és manté en FF o en LL. En el darrer cas, es presenta un tau d'aproximadament 25 hores, mentre que en FF el tau és inferior a les 24 hores.

L'estudi, ja no només del ritme d'activitat, sinó del patró del ritme, va adquirint cada vegada més interès

ja que la forma de la funció reflecteix la suma de tots els oscil·ladors circadianis interns que la configuren. Per tal d'estudiar la forma del ritme, s'ha considerat el ritme dividit en dues fases (51): una fase d'activitat contínua, alfa, i un període de repòs continu, ro, estudiant-se la relació alfa/ro. Encara que alfa es considera contínua, en la realitat està dividida en diferents períodes o pics d'activitat. S'ha descrit que els rosegadors presenten un patró d'activitat bimodal, amb el qual es va proposar l'existència de dos oscil·ladors circadianis per a regular els ritmes de components de diferent activitat. Els patrons d'activitat dels hámsters consisteixen en dos pics (178,181), el més gran situat a l'inici de la fase alfa, que sol anar seguit d'un pic més petit i variable. Els canvis en aquest patró es correlacionen amb un canvi en l'estat reproductor. Va ser Aschoff (14) el primer que va interpretar els canvis en la durada d'alfa i ro, així com les variacions del pic en alfa, com a reflexos de la forma d'ona d'un oscil·lador senzill i la seva interacció amb un nivell d'activitat. Altres autors han estudiat la forma del ritme d'activitat motora mitjançant tècniques d'anàlisi espectral trobant corbes bi i trimodals (275). Altres autors han descrit la forma de la funció diària de rates com asimètrica, trobant-se que l'inici del període d'activitat es més agut que la part final del període (24).

El ritme d'activitat motora ve regulat pel NSQ. Lesions en el NSQ resulten en un augment dels ritmes ultradianis d'activitat, i poden ser causa d'una dissociació del oscil·ladors circadianis (51). Tal com s'ha comentat anteriorment, la pineal també té un paper en el control del ritme d'activitat, ja que la pinealectomia afecta la normal sincronització del ritme d'activitat en les rates.

S'ha proposat que el sistema dopaminèrgic estigui implicat en l'activitat motora, ja que variacions diürnes en el "binding" de receptors dopaminèrgics D2 va lligat amb l'activitat motora durant la fase fosca

(29).

Molts paràmetres que influeixen en el ritme d'activitat motora han estat descrits en parlar de sincronitzadors. L'aïllament és un altre paràmetre que influencia el ritme. S'han descrit diferències entre animals aïllats i col·lectius en components ultradiaris del ritme d'activitat. Aquestes diferències són més evidents en estudiar els efectes de l'anfetamina (57).

## 1.9. IMPORTANCIA PRACTICA DE LA CRONOBIOLOGIA

L'importància de la cronobiologia es deguda ja no només a constituir una ciència pròpia dins del coneixement de la matèria viva sinó en l'aplicació pràctica que té, el seu estudi, en la interpretació de qualsevol tipus d'experiment tant en animals com en clínica.

### 1.9.1. INTERPRETACIO I DISSENY D'EXPERIMENTS.

Moltes vegades, els valors d'una variable biològica s'expressen com la mitjana més uns límits fiducials o un error segons el sexe, l'edat i estat de salut del individu. En aquest marge d'error s'inclouen tota mena de sorolls, com el degut a possibles fallides del instrument de mesura, a la dificultat en estandaritzar els individus, a les condicions experimentals o a la variabilitat interindividual. El problema és que dins del marge d'error hi van incloses, sovint, les variacions relacionades amb els ritmes biològics. Per tant és molt més exacte saber el significat d'una variable biològica si es tenen valors de referència quantificats en el temps. D'aquesta manera, s'obtidria una sèrie de valors d'una variable que es presenten en forma d'una funció cosinusoidal amb límits de confiança. Aquesta mena de representació s'anomena cronodesme, del grec "lligat al temps" i va ser proposada per Halberg (1977). Així, si es disposa d'un cronodesme, es podrà saber amb una sola dada si el paràmetre en qüestió que s'està mesurant és normal o no. En la figura 4 es mostra el cronodesme del cortisol en humans. Amb aquest, es pot saber si qualsevol dada d'una hora concreta del dia està dins dels límits de la normalitat.

Les variacions circadianes han de ser tingudes en compte tant en l'interpretació dels resultats com en el disseny d'un experiment. Cal tenir present, i conèixer, quin és el cicle de llum a que està sotmés l'animal de laboratori, ja que el cicle de llum és el sincronitzador més important dels ritmes circadianes i potser d'altres ritmes. El cicle de llum més utilitzat

es el de LF 12:12, tot i que alguns autors (Halberg) recomanen un canvi de llum en animals rosegadors nocturns de 8L:16F ja que simula millor la sincronització humana (16 hores d'activitat i 8 de repós). També cal tenir present la presència d'altres possibles sincronitzadors com canvis cíclics en la temperatura, sorolls, o accés al menjar. És millor mantenir tots aquests paràmetres al màxim de constants possible i deixar només el cicle de llum com a paràmetre canviant. El conèixer el cicle de llum és important encara que no es realitzin estudis cronobiològics ja que permet predir quan els nivells d'un component en sang, orina o altres teixits, seràn més alts o més baixos. Per exemple, el màxim del nivell de corticosterona s'espera que coincideixi amb la transició de llum a fosc i el mínim 12 hores abans o després.

Igualment el fet de deixar els animals en llum constant comporta certs problemes en la interpretació de resultats. Per exemple, en LL disminueixen, o s'anul·len, alguns ritmes circadianis. Per altre banda, en condicions constants cada animal segueix el seu propi ritme, pel que en una mateixa hora, no tots els animals tindran el mateix nivell en un paràmetre o la mateixa resposta a un estimul. Aquest fet pot portar a conclusions errònies en fer una mitjana dels valors dels animals.

Una aproximació cronobiològica dels resultats produeix un augment de precisió i evita males interpretacions de dades clíniques i de laboratori.

#### 1.9.2. CALCUL DELS RITMES

Al iniciar un estudi cronobiològic cal definir previament a quin interval de temps es pendran les mostres, quina serà la durada del temps a mostrejar, T, i quin serà el nombre de dades que es pendran durant T. El establir aquests paràmetres depèn del ritme del paràmetre a determinar. Reinberg (195) recomana que per tenir una bona fiabilitat dels valors d'un ritme



circadiari cal fer un mostreig cada 4 hores, per un període  $\geq 24$  hores i el nombre de dades ha de ser  $\geq 36$ . Es a dir cal realitzar 6 mesures en un dia, cada 4 hores, per 6 individus diferents o en un mateix individu durant sis dies. També cal tenir present que el nombre d'armònics que es poden calcular en una sèrie de N dades, es  $(N-1)/2$ , val la pena tenir-ho en compte si tractem d'analitzar alhora ritmes ultradiaris i circadiaris per pendre correctament el temps de mostreig.

Un cop obtenides les dades, es molt útil fer la representació gràfica, ja que donen idea del mètode a utilitzar i donen un cert tipus d'informació que no es podria detectar d'altre manera. Per exemple, permet veure si la corba presenta asimetries i quina es la forma aparent de la funció. La representació de les dades individuals o mitjanes, d'un paràmetre en funció del temps es el cronograma. El plexograma es la representació de les dades recollides en un període de temps més llarg que el període del ritme a investigar ( $T > \tau$ ) al llarg de l'abscisa d'un període  $\tau$  determinat.

El següent pas es ja la detecció i quantificació matemàtica del ritme, sigui utilitzant el mètode del cosinor o bé l'anàlisi espectral.

#### 1.9.2.1. Mètode del cosinor

Aquest mètode, proposat per Halberg (21), consisteix en l'ajust de les dades, pel mètode dels mínims quadrats, a una funció cosinusoidal que segueixi l'equació

$$y(i) = M + A \cos (w t(i) + \theta)$$

On A es l'amplitud i M el mesor de la funció.

Per aplicar el cosinor s'assumeix que les dades estan normalment distribuïdes al voltant dels punts de temps mostrejats. Es testa l'hipòtesi  $A \ll 0$ . Es a dir, un ritme es valid pre a un període determinat quan la probabilitat  $p(A \ll 0) \leq 0.05$ .

Els resultats obtinguts del cosinor es poden representar de dues maneres. Una es per la representació de l'ajust de la funció cosinusoidal a les dades i l'altre es mitjançant una representació polar. En aquesta darrera, (veure figura 5),  $A$  i  $\theta$  es representen per una el·lipse d'error. Les estimacions i els punts finals de  $\theta$  es representen segons les referències de fase  $\theta(0) = 0$  i  $\tau = 24$  hores = 360°. En aquesta figura la projecció del vector en el cercle indica la posició de  $\theta$ . Les tangents de la el·lipse d'error dibuixades des del centre del cercle, indiquen el 95% de l'interval de confiança. La llargada del vector i la el·lipse donen el 95% de l'interval de confiança de  $A$ .

Aquest mètode té l'avantatge de que no cal que les mostres s'hagin pres a intervals de temps constants. En canvi, no es un mètode útil quan el fenomen periòdic es asimètric, ja que l'acrofase trobada pot no correspondre amb el pic real. El cosinor es calcula sempre per a un tau prèviament determinat.

#### 1.9.2.2. anàlisi espectral

Aquest mètode, o descomposició en series de Fourier, es basa en la descomposició de la funció periòdica en una serie de funcions periòdiques sinusoidals anomenades harmònics, on el període de cada una d'elles es submultiple de la funció de la que provenen.

Té l'avantatge de que permet detectar qualsevol periodicitat important tant en el domini dels ritmes circadianis com ultradianis o infradianis. Aquest mètode per ser l'utilitzat en aquest treball es descriu a l'apartat de metodologia.

## 2. PROPOSIT

Aquest treball esta basat en un experiment de més d'un any i mig d'observacions diàries. L'experiment ha estat dissenyat per tal d'estudiar alhora dos objectius principals: l'un ha estat l'estudi de l'evolució del patró del ritme circadiari d'activitat motora (RAM) de la rata mantinguda en condicions de curs lliure (llum constant) i el segon l'estudi del caracter hereditari del seu RAM.

Per a l'estudi de l'evolució del ritme ha calgut fer el registre continuat de l'activitat motora dels animals des del dia del seu desalletament fins a l'estat adult i en alguns cassos fins i tot senil. En aquest aspecte s'ha estudiat tot el que fa referència a l'aparició i maduració del RAM en la rata i a la variació del RAM amb l'edat en animals vells, estudiant-se també les diferències entre sexes.

El segon objectiu ha estat l'estudi del caràcter hereditari del patró del ritme d'activitat motora. L'estudi s'ha fet en tres generacions de rates mantingudes sempre en les mateixes condicions.

El disseny d'experiments apropiats per aquests dos objectius comporta la realització d'assajos de molt llarga durada. Per aquesta raó s'ha dissenyat un únic experiment que permeti l'estudi simultani dels dos aspectes per tal de no allargar més del necessari el temps de durada de l'experiment.

El disseny d'aquest experiment, ha consistit en el registre de l'activitat motora de rates, mascles i femelles, mantingudes sota condicions de llum constant, des del dia del seu desalletament fins una edat en que es podien considerar adultes. Entre aquests animals es van realitzar diversos creuaments i es van obtenir un total de 6 families agrupades en tres generacions. En alguns d'aquests animals també es va registrar la seva

activitat quan tenien més d'un any de vida. Atesa la consanguinitat de tots els animals de l'experiment, les diferències entre els diferents patrons d'activitat motora són molt petites. Per això ha estat necessari desenvolupar i posar a punt una metodologia d'anàlisi estadística molt fina i al mateix temps força complexa a nivell de càlcul.

La llarga durada de l'experiment ha permès estudiar profundament aspectes no descrits fins ara, de l'evolució i maduració del RAM en la rata. D'altre banda la utilització de successives generacions d'animals, malgrat la dificultat analítica que implica la semblança deguda a la consanguinitat, ha permès l'estudi dels factors hereditaris presents en el RAM de les diferents generacions.

Al ser aquesta línia de recerca relativament nova, en la que els mètodes d'anàlisi no estan encara plenament establerts, cal destacar l'important paper que, en un tipus de treball com aquest, té el triar o crear la metodologia adequada per l'anàlisi dels resultats. Més encara tenint en compte la complexitat del càlcul matemàtic i estadístic degut a la gran quantitat de dades. Degut a això ens hem trobat en la necessitat d'anar cercant nous mètodes de càlcul, que si bé alguns d'ells ja són coneguts en altres disciplines, no formaven una metodologia directament aplicable al nostre tipus d'experiment. Altres mètodes de càlcul utilitzats són totalment inèdits. Obviament, aquest treball ha comportat la realització de nous programes per ordinador, així com la modificació d'alguns dels que ja es disposaven per tal de fer-los adients als nostres objectius.

### 3. MATERIAL I METODES

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1. ANIMALS

Per a l'experiment s'han utilitzat rates Sprague-Dawley dels dos sexes. Tots els animals en neixer van ser criats conjuntament amb la seva mare fins el dia del desalletament, en que van ser aïllats en gàbies individuals fins a completar el període d'observació corresponent.

##### 3.1.2 CONDICIONS DE MANTENIMENT

Els animals van ser criats i mantinguts en una habitació insonoritzada, a 18-19 °C, sota un patró d'il·luminació de llum constant.

Per a l'observació, els animals es van col·locar en gàbies de plàstic transparents de 25x25x14 cm cobertes per una reixa d'acer inoxidable amb el pinso i el biberó plé d'aigua. El terra de la gàbia estava recobert per una capa d'encenalls. Els animals en tot moment van tenir lliure accés al menjar i a l'aigua de beguda.

Les gàbies d'observació van ser posades damunt les unitats sensores, les quals estaven al terra de la cambra, l'una al costat de l'altre. Per tal que els animals no es veiessin entre ells, es van col·locar entre les unitats sensores, plaques de "porexpan".

La cambra d'observació estava aïllada acústicament i tampoc no hi entrava claror de l'exterior, de manera que la il·luminació era controlada i constant. Aquesta cambra, on hi havia les unitats sensores i les gàbies, tenia unes dimensions de 2.40 m x 1.90 m x 2.40 m i

estava il·luminada per dos tubs fluorescents de W que donaven una llum de 500 lux. Dins la cambra hi havia també un termòmetre de màximes i mínimes pel control de la temperatura. La temperatura es mantenia constant entre 18-20 °C mitjançant un sistema acondicionador d'aire comú per a tot l'estabulari, que permetia la renovació d'aire de la habitació. Fora de la cambra d'observació hi havia els aparells per al registre de les dades, per tal de que els sorolls periòdics produïts pel funcionament de la impressora no interferissin en el registre, amb una possible sincronització dels animals.

### 3.1.3. APARELLS

#### 3.1.3.1. Unitats de detecció de l'activitat motora

Per a la detecció de la activitat motora es va utilitzar un mètode òptic de detecció consistent en 6 unitats sensores de feixos IR creuats construïdes en el departament de Fisiologia Animal de la Facultat de Farmàcia. Amb aquest sistema, la detecció es produeix cada cop que l'animal talla qualsevol dels dos feixos que travessen la gàbia perpendicularment. Això dona lloc a impulsos TTL que són enviats als comptadors i enregistrats. Els emissors de llum utilitzats eren emissors infrarrojos del tipus TIL31 que resulten invisibles pels animals emprats i a més no són interferits per la llum visible ambiental. El circuit estava dissenyat de manera que si alguna brossa obstruïa un feix, no s'impedís el funcionament normal de l'altre feix. Els feixos de llum quedaven a uns 1.5 cm del terra a on estava l'animal.

Es va triar aquest mètode per a la detecció de l'activitat motora, per que al no diferenciar bé entre moviments de petita i gran amplitud (61), resulta adequat per a discriminar períodes de poca activitat. Al mateix temps es un bon mètode per a la detecció dels components ultradiaris del ritme, que són els que donen

la forma característica a la funció d'activitat, en modular el ritme circadiari. A més, les mesures fetes amb aquest mètode no són influenciades per la massa de l'animal, els comptatges són únicament deguts a la seva locomoció.

### 3.1.3.3. Comptadors, multiplexor i impressora

Els impulsos provinents de les plaques sensores anaven a tres comptadors digitals de dos canals cada un, amb indicació numèrica (Panlab Pb 602). Tots els comptadors disposaven d'una sortida de dades codificada en BCD. Les sortides dels comptadors estaven connectades a un multiplexor programable de vuit vies que tenia la sortida connectada a una impressora sobre paper. El multiplexor es va programar de manera que es produís la impressió dels continguts totals dels comptadors cada 30 minuts deixant aquests, després de cada impressió, a zero.

### 3.1.3.3. Unitats pel tractament de les dades

L'equip utilitzat pel tractament de les dades ha estat un microordinador Sharp MZ-80B, amb una impressora gràfica Sharp MZ-80 P5, una unitat de dos discs tous Sharp MZ-80FB i un plotter Taxan KPL 710.

Per alguns càlculs també s'ha utilitzat un microordinador Sharp PC 7000 amb una impressora gràfica Star NL 10.

### 3.2. EXPERIMENT

Com ja s'ha comentat, els objectius d'aquest experiment han estat l'estudi de l'evolució i del caràcter hereditari del patró circadiari d'activitat motora dels animals.

El disseny de l'experiment ha comportat l'obtenció de tres generacions successives de rates, havent-se de registrar l'activitat motora el més aviat possible, des del desalletament. Com en tot experiment, algunes vegades han surgit dificultats tècniques no esperades. Degut a la llarga durada d'aquest experiment, aquests motius han obligat, en ocasions, a introduir petits canvis en el disseny inicial de l'experiment i a reestructurar alguns aspectes.

#### 3.2.1. DISSENY

Una parella de rates adultes, Sprague-Dawley, nascudes en condicions de llum-fosc, es van creuar i van ser col·locades en la cambra d'observació en condicions de llum constant. En aquesta cambra i en les condicions descrites anteriorment és a on es va realitzar l'experiment. En la figura ## es mostra l'esquema dels creuaments realitzats.

Als 21 dies després del creuament van neixer les primeres cries. Aquests animals, en el dia del desalletament, al cap de 21 dies, van ser separats i col·locats en gàbies individuals. Es van triar 5 animals, dues femelles i tres mascles, que van ser identificats com:

F1 F2 F3 M4 M5

Aquests animals formen la família "1" que correspon a la primera generació de rates nascudes en LL.

Per tal d'identificar clarament als animals s'ha utilitzat una nomenclatura en la que els tots els



animals de l'experiment sencer s'han numerat de l'1 al 33 sense tenir en compte la família a que pertanyen. La lletra F davant del número indica que es tracta d'una femella i la M d'un mascle. Les famílies s'han numerat independentment de l'1 al 6.

A partir del dia del desalletament de la família "1" es va començar el registre de l'activitat motora dels animals. El registre de l'activitat motora es va fer de manera contínua fins al dia 34 deprés del deslletament.

L'activitat motora dels animals es va tornar a registrar una altra vegada del dia 45 al 65. En el dia 65 es van creuar el M4 amb la femella F1. A continuació es va tornar a registrar la activitat motora de tots els animals, dels dies 84 al 111. Per a la F1 prenyada aquests dies de registre coincidirien amb els 4 dies abans del naixement de les cries i tot l'alletament. D'aquesta manera es podria disposar de dades de les cries abans de ser aïllades.

Els animals provinents del creuament entre la F1 i l'M4 formaven una nova família de rates que va ser identificada com família "2". En el dia 21 després del neixement d'aquesta família, es varen aïllar tres femelles i dos mascles en gàbies individuals, enregistrant-se la seva activitat motora des del dia 5 fins al 46 després del deslletament. Aquests animals varen ser numerats del 6 al 10:

F6 F7 F8 M9 M10

Paral·lelament al registre de la família "2" la F1 es va creuar amb el M3.

Les cries resultants d'aquest nou creuament varen formar la família "3". Als 21 dies després del naixement es van separar tres femelles i dos mascles que van ser aïllats en gàbies individuals i identificats com :

F11 F12 F13 M14 M15

L'activitat motora d'aquests animals es va enregistrar des del dia del deslletament fins a 78 dies després.

Ja que en els propers creuaments els animals de les diferents famílies haurien d'estar en la cambra d'observació, encara que no fossin enregistrades, degut a manca d'espai, vam fer una assaig previ per tal de trobar en quin grau la presència d'altres rates a l'habitació afectava al ritme endògen dels animals.

Per a estudiar-ho, es varen posar durant els dies 64 al 78 del registre dels animals de la família "3", 6 rates, tres mascles i tres femelles, en gàbies separades, tal com estarien els animals en els propers experiments. Les noves rates provenien de l'estabulari i havien estat sota cicles de llum-fosc fins al dia que es van traslladar a la cambra d'observació, es a dir, que no tenien cap parentiu, ni teòricament cap semblança de ritme amb les rates de l'experiment.

Amb els animals de la família "3" es van realitzar nous creuaments per tal d'obtenir els animals de la tercera generació. En un principi, com es disposava de tres femelles i dos mascles, es va pensar en obtenir 6 famílies per la tercera generació, que provindrien dels creuaments de cadascun dels mascles amb les tres femelles. Aquests creuaments no varen poder ser realitzats ja que el M15 va morir després del creuament amb la F11, i la F12 era estèril. Amb això, els creuaments que es varen obtenir per a la tercera generació van ser els del M14 amb la F11 i la F13, i el del M15 amb la F11.

D'aquests, el primer creuament realitzat va ser el del M14 amb la F11, obtenint-se la família "4". L'activitat motora de la F11 prenyada es va enregistrar durant els períodes de gestació i alletament. En el dia del deslletament es varen separar els animals dels que es detectaria la seva activitat motora, però varen morir els mascles i només van poder ser enregistrades tres femelles que van ser identificades com:

F16 F17 F18

L'activitat motora d'aquests animals va ser enregistrada des del dia 1 fins al 56 després del desalletament.

Posteriorment, per tal d'aconseguir més animals d'aquesta família, es va repetir aquest creuament entre en M14 i la F11. Aquesta vegada es van obtenir tres femelles i dos mascles identificats per:

F19 F20 F21 M22 M23

L'activitat motora d'aquests nous animals va ser enregistrada des del dia 1 fins al dia 28 després del desalletament. No es va poder seguir el registre durant més temps degut a fallides del sistema d'il·luminació.

A continuació, es van creuar les rates M14 i F13 que van donar lloc a la família "5". L'activitat motora de la femella tres també va ser enregistrada durant els períodes de gestació i alletament. En el dia del desalletament es van triar tres femelles i dos mascles identificats per:

F24 F25 F26 M27 M28

L'activitat motora d'aquestes rates va ser enregistrada des del dia 1 fins al 41 després del desalletament.

Mentre es realitzava el registre de la família "5" es van creuar la F11 amb l'M15 obtenint-se els animals de la família "6". En el dia del desalletament es van separar dos femelles i tres mascles :

F29 F30 M31 M32 M33

El registre de l'activitat motora d'aquests animals va durar del dia 29 al 45 després del desalletament, ja que el registre en aquests dies es suficient per a identificar el ritme d'activitat propi dels animals adults i ja ens serviria per a l'anàlisi comparatiu entre famílies.

Per a completar l'estudi evolutiu calia realitzar un registre de l'activitat motora de rates en edat avançada. Per aquest motiu, es va tornar a registrar l'activitat motora de les rates de la família "3", que tenien un any d'edat. L'activitat d'aquests animals es va registrar durant 16 dies, del 328 al 343 després del desalletament. Els animals van ser col·locats sobre la mateixa unitat sensora en que havien estat registrats en ser desalletats per tal de no trobar diferències degudes a un canvi d'aparell. La placa a on estava la F13 es va espatllar al seté dia del registre pel que no es va poder enregistrar més temps. Es per aixó que la F13 no s'ha tingut en compte en l'estudi del ritme dels animals en edat avançada.

### 3.2.2. ASPECTES PRACTICS

Durant tot l'experiment, que va implicar un any i mig de registre gairebé continuat, els animals només van ser manipulats al ser creuats, en el dia del desalletament i per a la neteja de les gàbies.

La neteja de les gàbies es va realitzar de forma no periòdica cada 7-10 dies i a diferents hores del dia cada vegada, per tal que les entrades a la cambra no actuessin com a sincronitzadors periòdics dels animals. En aquestes entrades, s'aprofitava per a canviar l'aigua dels biberons i afegir més menjar. Després d'aquestes entrades l'activitat no es registrava durant les tres hores següents.

Cal dir que durant tot aquest temps es varen produir alguns talls, de curta durada, en el subministrament elèctric. Sempre que aixó va succeir, l'activitat motora no es va enregistrar durant períodes de temps de 2-5 dies, després del tall, segons el cas, per tal que els animals poguessin tornar a recuperar el seu propi ritme. Els talls elèctrics anotats van succeir durant els registres de les següents famílies:

## Material i mètodes

- En el dia 45 del registre de la família "1"
- En el dia 49 del registre de la família "2"
- En el dia 15 del registre de la família "5"
- En el dia 41 del registre de la família "6"
- Tres dies abans del registre de la família "3" als 328 dies d'edat.

### 3.3. ANALISI MATEMÀTICA I ESTADÍSTICA

#### 3.3.1. PERIODEGRAMA

Al estar els animals en condicions de llum constant, el ritme d'activitat segueix el seu propi període endògen,  $\tau$ , que té, en rates, un valor superior a les 24 hores per tractar-se d'animals nocturns.

Com que el  $\tau$  és una de les principals característiques del ritme endògen, caldrà utilitzar tècniques de càlcul molt precisses per la seva determinació. En aquest treball s'ha utilitzat el mètode proposat per Sokolove (230) que consisteix en el càlcul del períodegrama segons Enright (67) i la construcció d'un estadístic que permeti determinar la significació dels pics del períodegrama.

Per a l'explicació d'aquest mètode es considerarà un experiment semblant al d'aquest treball, on es registra l'activitat motora a intervals regulars i durant un temps relativament llarg, un mínim de 10 dies. Si en aquesta sèrie de dades el període de cada cicle, el  $\tau$  que es vol trobar, es de  $P$  unitats de temps, resulta que els valors de les dades es repeteixen aproximadament cada  $P$  unitats de temps. Segons això, el càlcul del períodegrama es farà tal com es mostra a continuació.

##### 3.3.1.1. Càlcul de períodegrama

Primerament s'anoten les dades d'activitat motora de cada unitat de temps de la següent manera:

1	2	3	...	P
X(1)	X(2)	X(3)	...	X(P)
X(P+1)	X(P+2)	X(P+3)	...	X(2P)
X(2P+1)	X(2P+2)	X(2P+3)	...	X(3P)
.....				
X(KP+1)	X(KP+2)	X(KP+3)	...	X((K+1)P)
$\bar{X}(1)$	$\bar{X}(2)$	$\bar{X}(3)$	...	$\bar{X}(P)$

on,  $x(i)$  es el valor de la dada  $i$ , ( $1 \leq i \leq N$ ).

$K$  es el nombre de files menys 1.

$N$  es el nombre de recomptes, o nombre de valors d' $X$ .

Per la disposició de la taula,  $N=(k+1)P$ .

$h$  és l'index d'una columna en una serie de  $X(i)$  que tingui  $P$  columnes ( $1 \leq h \leq P$ ).

$\bar{X}(h)$  és la mitjana de les  $X(i)$  en la columna  $h$  de la serie.

Si la desviació estàndar de les mitjanes es  $\sigma_p$  per a un període  $P$  i la desviació estàndar de la sèrie de temps completa es  $\sigma_u$ , es demostra que la relació  $\sigma_p/\sigma_u$  es similar al períodegrama, i indica la similitud de  $P$  respecte al període real de la sèrie. Aquest fet també es pot observar a nivell intuïtiu, ja que en una fila, la part del fenomen que té de període  $P$  passarà per totes les fases d'un cicle complet i per tant, la part periòdica està en la mateixa fase en tots els termes de la mateixa columna. Si es produís alguna alteració en aquest ritme, o bé, el ritme tingués un període diferent de  $P$ , les mitjanes de les diferents columnes tendrien a ser iguals. Per tant, si el ritme segueix un període  $P$ , la desviació estàndar entre les  $P$  mitjanes de les columnes serà molt més gran que quan no hi ha cap ritme d'aquest període a la sèrie.

Per a un període  $P$  determinat, les mitjanes de les columnes son:

$$\bar{X}(h,p) = k^{-1} \sum_{j=0}^{k-1} X_{h+jp} \quad (h=1,2,\dots,P)$$

El següent pas, consisteix en el càlcul de l'estadístic  $A_p$  que es defineix com

$$A_p = \left[ P^{-1} \sum_{h=1}^P (X_{h,p} - \bar{X}_p)^2 \right]^{1/2}$$

on,  $\bar{X}_p = \frac{1}{P} \sum \bar{X}_{h,p}$

Quan  $p$  es un nombre enter  $\bar{X}_p = \bar{X}$

La representació gràfica d' $A_p$  en front de  $P$  és el períodegrama. Si en la sèrie hi ha un component oscil·latori estable de període  $T$ , la gràfica arribarà al seu màxim quan  $P$  sigui igual a  $T$ .

$A_p^2$  és l'estimació de la variància de  $P$  mitjanes ( $\bar{X}(1) \dots \bar{X}(p)$ ) de  $K$  components d'una població de  $N$  valors ( $x(1) \dots x(N)$ ). Si aquests valors estan normalment distribuïts amb una variància  $\sigma(x)^2$ , la variància de les mitjanes serà:

$$\sigma^2 = \frac{\sigma_x^2}{k}$$

Amb això es demostra que l'estadístic  $Q_p$  segueix una distribució Xi quadrat amb  $P-1$  graus de llibertat.  $Q_p$  es defineix com:



$$Q_p = \frac{F(A_p)^2}{\sigma(x)^2} = \frac{\sum_{h=1}^P K_h (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

Simplificant,

$$Q_p = \frac{\sum K_h (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{\frac{1}{N} \sum (X_i - \bar{X})^2}$$

Aquest estadístic  $Q_p$ , permet l'utilització del test Xi quadrat, per a indicar la presència o absència d'un ritme d'un període determinat per a una sèrie de temps. Per a disminuir els errors, la sèrie ha de ser com a mínim de 10 dies de durada.

Per trobar el nivell de significació del Xi amb el que s'ha de treballar es fa de la següent manera. Si s'analitzen n períodes diferents de temps i treballem a un nivell de significació  $\alpha$ , la probabilitat de que un pic no significatiu del períodegrama surti com a tal serà:

$$\begin{aligned} \text{Prob (un o més falsos pics)} &= 1 - \text{prob (no falsos pics)} \\ &= 1 - (1 - \alpha)^n \end{aligned}$$

Si per exemple n fós igual a 20 i el nivell de significació a que es volgués treballar fós de 0.01, la probabilitat de trobar un fals pic seria igual a 0.2. Per tant, si es vol que la probabilitat de que un fals pic es pugui considerar significatiu sigui inferior a

$\alpha = 0,05$ , el risc en que s'haurà de treballar serà:

$$\alpha^2 = 1 - (1 - \alpha)^n$$

$$1 - \alpha = (1 - \alpha)^n$$

$$\alpha = (1 - \alpha^2)^{1/2}$$

Si, com es el nostre cas, es calcula la significació dels períodes existents entre 1400 i 1600 cada 5 minuts, es tindrà que el nivell  $\alpha$  en el que s'haurà de treballar serà de  $\alpha = 0,00128$  ( $\alpha^2 = 0,05$  i  $n=40$ ). Es a dir, cal que la significació dels pics del períodegrama s'assagin a un nivell de significació de 0,001 mitjançant un test Xi quadrat.

### 3.3.1.2. Càlcul de la significació del Xi quadrat

Degut a que el nombre de graus de llibertat de Xi quadrat era molt elevat i no es troben tabulats, el càlcul dels valors de Xi quadrat per a un risc  $\alpha$  es va haver de fer de la següent manera.

$$X_{\alpha}^2 \approx V (1 - a^2 + X_{\alpha} a)^2$$

on,

$$a = \left[ \frac{2}{9V} \right]^{1/2} \quad \text{i} \quad \alpha = 1 - P(X_{\alpha})$$

Per al càlcul de  $X_{\alpha}^2$  fem (1):

$$X_{\alpha} \approx t - \frac{C_0 + t (C_1 + tC_2)}{1 + t (d_1 + t (d_2 + td_3))}$$

on

$$t = \left[ \ln \frac{1}{\alpha^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$\begin{aligned} C_0 &= 2.51557 \\ C_1 &= 0.802853 \\ C_2 &= 0.010328 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d_1 &= 1.432788 \\ d_2 &= 0.189269 \\ d_3 &= 0.001308 \end{aligned}$$

### 3.3.2. ANALISI DE MODELS LINIALS

S'ha utilitzat aquest tipus d'anàlisi estadística per tal d'estudiar les causes de variació dels diferents paràmetres dels ritmes, considerats de manera individual. En l'anàlisi per models linials és considera que cada paràmetre estudiat (resposta) està influït per una sèrie de causes de variació (variables). En el present experiment s'han utilitzat com a respostes l'AMT o el MESOR, el tau i el CPH1. Com a variables s'han considerat les diferents famílies, generacions o sexes.

#### 3.3.2.1. Càlcul

En l'anàlisi per models linials es considera de que cada observació,  $y$  (variable independent), és una funció lineal d'una sèrie de variables,  $x$ , (variables independents) que són les variables del model.

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_mx_m + e$$

on,  $b_1, \dots, b_m$  són els paràmetres del model i  $e$  és l'error que no queda explicat pel model.

En la realitat,  $y$  i  $x$  es coneixen i es tracta de calcular  $b$ . En forma matricial es pot expressar l'equació anterior de manera:

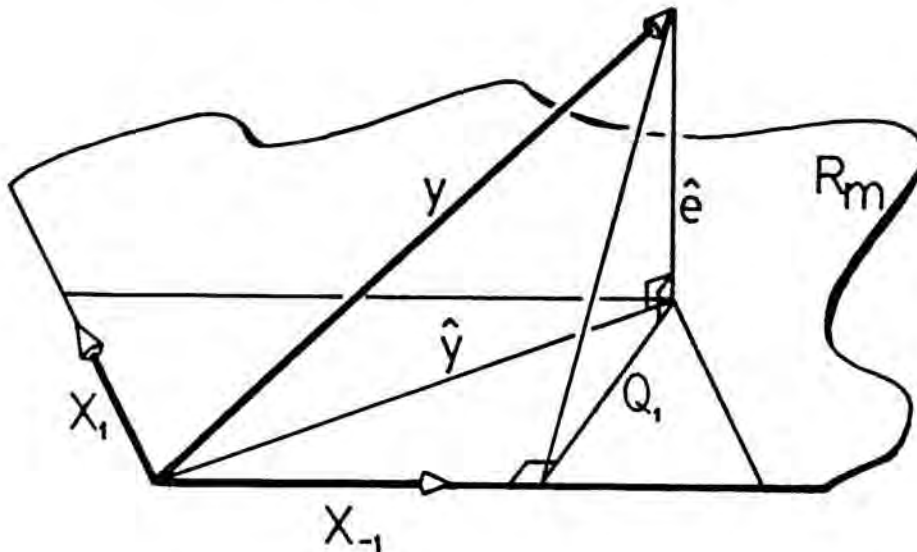
$$y = X b + e$$

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ \dots \\ y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ \dots \\ b_m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ \dots \\ e_n \end{bmatrix}$$

L'estimació de  $\mathbf{b}$  es fa pel mètode dels mínims quadrats obtenint l'equació:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}'\mathbf{y}$$

Coneixent  $\mathbf{b}$  es pot fer una estimació d' $\mathbf{y}$  partint d' $\mathbf{x}$ . Geomètricament, això es representa:



on,  $\mathbf{x}_i$  es un vector qualsevol de la matriu  $\mathbf{X}$  i  $\mathbf{X}_{-i}$  és la resta de vectors de la matriu  $\mathbf{X}$ .  
 $R_m$  es el subespai de  $R_n$  definit per  $\mathbf{X}$ .

Segons això, es pot demostrar que l'error quadràtic,  $\mathbf{e}$ , és mínim amb l'estimació feta segons 3, demostrant que  $\mathbf{e}$  és normal a  $R_m$  o a  $\mathbf{X}$ .

Si  $\mathbf{e}$  i  $\mathbf{X}$  són perpendiculars,  $\mathbf{e}'\mathbf{X} = 0$

Com que  $\mathbf{e} = \mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}}$  tindrem

$$\begin{aligned}
 e'X &= (y-\hat{y})'X \\
 &= y'X - \hat{y}'X \\
 &= y'X - b'X'X
 \end{aligned}$$

Segons 3 tenim  $X'Xb = X'y$ , per tant

$$e'X = y'X - b'X'X = y'X - y'X = 0$$

La suma de quadrats del model  $SQy = y'y$  es pot descomposar en els seus components ortogonals deguts al model i a l'error, així tenim:

$SQy = y'y$  : Suma de quadrats total o variació total

$SQ\hat{y} = \hat{y}'\hat{y} = b'X'Xb = y'Xb$  : Suma de quadrats del model o variació explicada

$SQe = e'e$  : Suma de quadrats de l'error o variació no explicada

que compleixen les següents relacions

$$SQy = SQ\hat{y} + SQe$$

$$SQ\hat{y} = \hat{y}'\hat{y} = b'X'Xb = y'Xb$$

$$SQe = y'y - y'Xb$$

Que són les fórmules emprades per l'anàlisi de la variància.

Coneixent els valors de  $b$ , es pot estimar qualsevol  $y$  corresponent a una situació real o imaginària, que ve determinada per uns valors fixos de les variables  $x$ , que anomenarem  $x_0$ . Així doncs, l'estimació d' $y$  corresponent a  $x_0$  serà:

$Y_0 = b x_0$  amb uns límits fiducials, calculats segons

$$Y_0 = \hat{y}_0 \pm t_{(v, 0.05)} s(1/g + x_0'(X'X)^{-1}x_0)^{1/2}$$

on,  $s^2$  és la variància mostral :  $\frac{1}{n-m} e'e$

$g$  és el nombre d'elements de l'estimació  
 $v$  són els graus de llibertat:  $n-m$

Aquestes estimacions corresponen a funcions dels paràmetres ( $x_0$ ) del model, i per això es coneixen com a funcions paramètriques estimables (FPE)

La significació d'una FPE es determinarà calculant la probabilitat de que el seu interval de confiança pugui incloure el valor zero. Les FPE poden representar una situació concreta, una diferència entre dues situacions, etc. En general, la funció paramètrica corresponent a la diferència entre dues situacions és

$$x_0 = x_a - x_b$$

i l'estimació d'aquesta diferència serà

$$\hat{y}_0 = b(x_a - x_b) = b x_0$$

i en general, l'estimació de la diferència entre una situació i un valor teòric d' $y$ , ( $m$ ), serà:

$$m - b x_0$$

Per calcular la significació d'aquestes diferències cal plantejar la hipòtesi nula:

$$H_0 : m - b x_0 = 0$$

Cal senyalar que es poden estudiar simultaniament p F.P.E. obtenint una matriu  $H$  ( $p \times m$ ) que es denomina matriu de la hipòtesi nula, de forma que

$$H_0 : m - b H = 0$$

La significació de  $H_0$  es calcula mitjançant una  $F$  de Snedecor.

$$F_H = \frac{1}{ps^2} (H'b - M)' \left[ H' (XX)^{-1} H \right] (H'b - M)$$

Normalment  $M = 0$  amb el que

$$F_H = \frac{1}{ps^2} b'H \left[ H' (X'X)^{-1} \right]^{-1} H'b$$



### 3.3.3. ANALISI DE FOURIER

S'ha realitzat l'anàlisi de Fourier, totes les dades d'activitat motora, prenent com a període principal el propi  $\tau$  de cada animal. En cada cas, es va fer una anàlisi amb les dades diàries (1440 minuts) més les dades dels minuts del dia següent que manquessin fins a completar el període  $\tau$ .

L'anàlisi de Fourier permet caracteritzar la forma d'ona d'una funció determinada. En general, consisteix en la descomposició d'una funció periòdica qualsevol en la suma d'una colla de funcions sinusoidals, anomenada sèrie harmònica, en la que la freqüència de cada funció sinusoidal es múltiple de la freqüència fonamental. Els avantatges d'utilitzar una sèrie harmònica radiquen en el fet que aquestes funcions són ortogonals entre elles.

#### 3.3.3.1. Plantejament

L'anàlisi de Fourier s'ha realitzat per una aproximació geomètrica a un model linial (21, 89).

Es disposa d'una sèrie d' $n$  observacions realitzades al llarg d'un temps  $T$ . Així, la sèrie de dades prendrà els valors  $y_1, \dots, y_n$ . El mostreig es regular (MR) quan es compleix :

$$t_i - t_{i+1} = t_j - t_{j+1}, \text{ per tot } i \neq j$$

En el present experiment  $T$  es farà igual al  $\tau$  de cada animal.

Si aquesta equació no es compleix, el mostreig es irregular (MI).

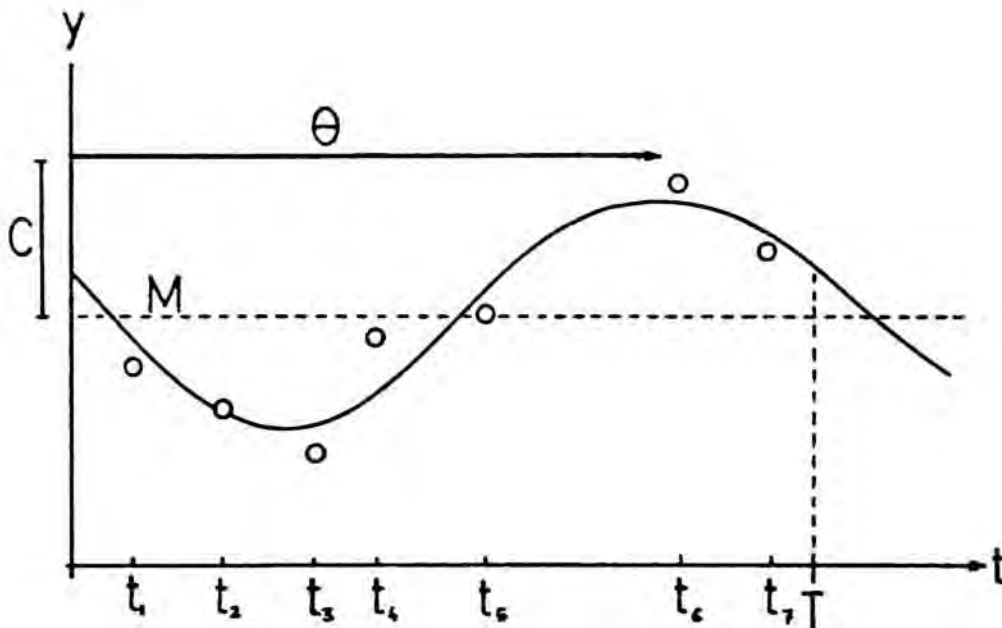
El cas més senzill d'anàlisi es quan es considera que totes les dades s'ajusten a una sola funció sinusoidal, realitzant-se el càlcul d'un sol harmònic.

La funció sinusoidal a la que s'ajusten les dades és:

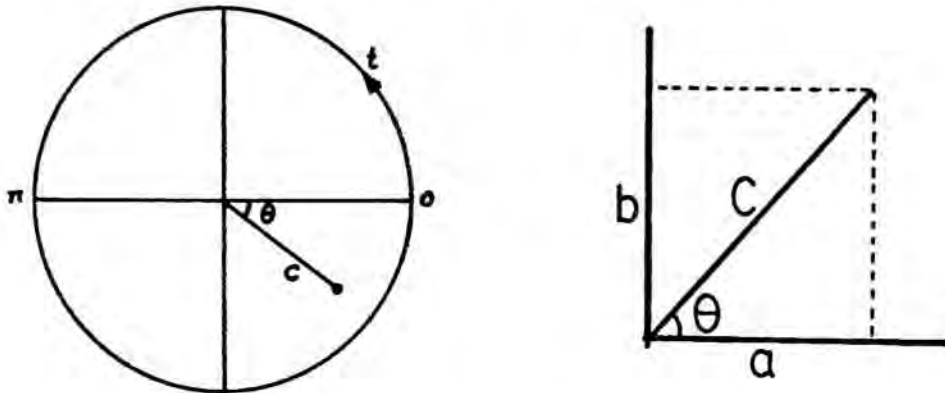
$$Y = M + A \cos (wt - \theta) + e \quad 1$$

- on,  $Y$  = Variable observada  
 $M$  = MESOR o valor mitjà de la funció  
 $A$  = Amplitud de l'oscil.lació  
 $w$  = Velocitat angular  
 $t$  = Temps  
 $\theta$  = Angle de Fase  
 $e$  = Error

L'ajust de la funció sinusoidal a les dades s'esquemmatitza en la figura següent:



Un altre manera de representar la funció sinusoidal ajustada es mitjançant una representació angular de manera que el període de la funció valgui  $2\pi$ :



Si en lloc de considerar una sola funció sinusoidal ajustem les dades a una sèrie de  $m$  harmònics, es a dir, calculem tot un espectre de funcions en que la freqüència dels diferents harmònics sigui submultiple de la de l'harmònic principal (l'harmònic principal es el que té com a període el  $\tau$ ), llavors l'equació 1 vindrà expressada com:

$$Y = M + \sum_{i=1}^m A_i \cos(\omega_i t - \theta_i) + e_m \quad 2$$

En una representació angular les diferències entre els diferents harmònics venen donades per la seva velocitat angular  $\omega_i$  de manera que :

per el primer harmònic  $\omega_1 = \frac{2\pi}{T}$

per el segon harmònic  $\omega_2 = \frac{4\pi}{T}$

.....

per l'harmoni i  $\omega_i = \frac{i2\pi}{T}$

### 3.3.3.2. Estimació dels harmònics

L'ajust de les dades a l'equació 2 es fa amb un model lineal. Previament cal inicialitzar el segon terme de l'equació.

Per la fórmula de  $\cos(a-b)$  es tindrà que :

$$A \cos(\omega t - \theta) = A \cos(\omega t) \cos\theta + A \sin(\omega t) \sin\theta$$

$A \cos\theta$  i  $A \sin\theta$  són dos valors constants, per tant podem fer:

$$a = A \cos\theta \quad i \quad b = A \sin\theta$$

Llavors

$$A \cos(\omega t - \theta) = b \sin(\omega t)$$

Segons aixó, l'equació 2 quedarà escrita de la següent manera:

$$Y = M + \sum_{i=1}^m \left[ a_i \cos(\omega_i t) + b_i \sin(\omega_i t) \right] + \sum_{i=1}^m e_i \quad 3$$

on,  $M$ ,  $a_i$ ,  $b_i$  son els paràmetres a estimar a partir de les dades experimentals.  $a_i$  i  $b_i$  son els coeficients de Fourier per a l'armònic  $i$ .

L'equació 3 pot expressar-se en forma matricial, de manera:

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \dots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} M+a_1 \cos w_1 t_1 + b_1 \sin w_1 t_1 + \dots + a_m \cos w_m t_1 + b_m \sin w_m t_1 \\ M+a_1 \cos w_1 t_2 + b_1 \sin w_1 t_2 + \dots + a_m \cos w_m t_2 + b_m \sin w_m t_2 \\ \dots \\ M+a_1 \cos w_1 t_n + b_1 \sin w_1 t_n + \dots + a_m \cos w_m t_n + b_m \sin w_m t_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_n \end{bmatrix}$$

o, el que es el mateix:

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \dots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \cos w_1 t_1 \sin w_1 t_1 \dots \cos w_m t_1 \sin w_m t_1 \\ 1 \cos w_1 t_2 \sin w_1 t_2 \dots \cos w_m t_2 \sin w_m t_2 \\ \dots \\ 1 \cos w_1 t_n \sin w_1 t_n \dots \cos w_m t_n \sin w_m t_n \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} M \\ a_1 \\ b_1 \\ \dots \\ a_m \\ b_m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_n \end{bmatrix}$$

Aquesta última notació pot abreujar-se de la següent manera:

$$y = X b + e$$

on,  $y$  es el vector d'observacions  
 $X$  es la matriu de disseny  
 $b$  es el vector de paràmetres  
 $e$  es el vector d'errors

Es pot demostrar (89) que l'estimador de  $b$ ,  $\hat{b}$ , pel mètode dels mínims quadrats ve definit per:

$$\hat{b} = \begin{bmatrix} \Gamma \\ X'X \\ L \end{bmatrix}^{-1} X'y$$

Per simplificar les notacions, es farà:

$$C_i = \cos(w_i t)$$

$$S_i = \sin(w_i t)$$

Així doncs, les matrius  $X'X$  i  $X'y$  seràn:

$$X'X = \begin{bmatrix} n & \Sigma C_1 & \Sigma S_1 & \dots & \Sigma C_m & \Sigma S_m \\ \Sigma C_1 & \Sigma C_1^2 & \Sigma C_1 S_1 & \dots & \Sigma C_1 C_m & \Sigma C_1 S_m \\ \Sigma S_1 & \Sigma S_1 C_1 & \Sigma S_1^2 & \dots & \Sigma S_1 C_m & \Sigma S_1 S_m \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \Sigma C_m & \Sigma C_m C_1 & \Sigma C_m S_1 & \dots & \Sigma C_m^2 & \Sigma C_m S_m \\ \Sigma S_m & \Sigma S_m C_1 & \Sigma S_m S_1 & \dots & \Sigma S_m C_m & \Sigma S_m^2 \end{bmatrix}$$

$$X'Y = \begin{bmatrix} \Sigma Y \\ \Sigma Y C_1 \\ \Sigma Y S_1 \\ \dots \\ \Sigma Y C_m \\ \Sigma Y S_m \end{bmatrix}$$

Si es tracta d'un mostreig regular, llavors

$$\Sigma C_i = \Sigma S_i = 0$$

$$\Sigma C_i^2 = \Sigma S_i^2 = n/2$$

$$\Sigma C_i C_j = \Sigma S_i S_j = \Sigma C_i S_j = 0 \quad \text{per } i \neq j$$

Aquesta darrera igualtat demostra l'ortogonalitat de les columnes de la matriu.

Així doncs, quan les columnes son ortogonals, es a dir en el cas d'un M.R., els càlculs es simplifiquen considerablement ja que :

$$X'X = \begin{bmatrix} n & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & n/2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & n/2 & \dots & 0 \\ \vdots & & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & \dots & \dots & n/2 \end{bmatrix}$$

Llavors,

$$[X'X]^{-1} = \frac{1}{n} \text{Dia} [1, 2, 2, \dots, 2]$$

$$b = [X'X]^{-1} X'Y$$

$$b = \frac{1}{n} \text{Dia} [1, 2, 2, \dots, 2] * \begin{bmatrix} \Sigma y \\ \Sigma y C_1 \\ \Sigma y S_1 \\ \dots \\ \Sigma y C_m \\ \Sigma y S_m \end{bmatrix} = \frac{1}{n} \begin{bmatrix} \Sigma y \\ 2\Sigma y C_1 \\ 2\Sigma y S_1 \\ \dots \\ 2\Sigma y C_m \\ 2\Sigma y S_m \end{bmatrix}$$

Com que  $b$  és el vector de paràmetres

$$b = \begin{bmatrix} M \\ a_1 \\ b_1 \\ \dots \\ a_m \\ b_m \end{bmatrix}$$

s'obté finalment:



$$M = 1/n \sum y$$

$$a_i = 2/n \sum y C_i \quad 4$$

$$b_i = 2/n \sum v C_i$$

En tots els cassos es compleix:

$$C_i = (a_i^2 + b_i^2)^{1/2} \quad 5$$

$$\bar{\varphi}_i = \text{atg } b_i/a_i$$

Per determinar el quadrant en que es troba l'harmònic en la representació angular, es considera:

$$\theta_i = \text{atg}(b_i/a_i) - (a < \bar{\varphi}) \pi \quad \begin{array}{l} \text{Si} = -1 \\ \text{No} = 0 \end{array}$$

L'angle trobat s'ha de transformar en un angle positiu inferior a  $2\pi$ . La transformació al mínim angle positiu es realitza fent:

$$\theta_i = (\theta_i + 2\pi) - 2\pi \text{int} \frac{\theta_i + 2\pi}{2\pi}$$

Si es tractés d'una funció continua  $y = f(t)$ , llavors s'obtenen les fórmules d'Euler, que venen a representar la forma continua de les fórmules 4

$$M = C_0 = 1/n \int_0^T f(t) dt$$

$$a_i = 2/n \int_0^T f(t) \cos(\omega_i t) dt$$

$$b_i = 2/n \int_0^T f(t) \sin(\omega_i t) dt$$

El fet que les columnes de la matriu siguin ortogonals entre elles implica que les estimacions dels paràmetres no canvien si es calculen menys harmònics de les freqüències possibles.

Cal tenir en compte, que les simplificacions en el càlcul no sempre són possibles. Només es poden efectuar quan les dades són equidistants, és a dir quan es fa servir una sèrie de dades completa a on no manca cap dada (M.R.). En el cas de manca alguna dada, com a succeït algunes vegades al llarg del present experiment, el càlcul es torna molt més complex degut a que la matriu  $X^T X$  no es transforma en la matriu diagonal i cal operar amb la matriu sencera.

D'altra banda, en la demostració presentada en aquest apartat, s'ha suposat que  $e$  es l'error a l'atzar, que té de mitjana 0 i que els diferents  $e_i$  ( $i=1,2,\dots,N$ ) són independents. Si no es complís aquesta suposició les estimacions dels paràmetres no resultarien gaire afectades, però sí, en canvi que s'afectarien els nivells de confiança dels paràmetres.

### 3.3.3.3. Descomposició de la suma de quadrats

Un cop calculat el model cal trobar quina part de variança de les dades és capaç d'explicar.

En el present model, les variacions existents són les següents:

$SQ_y$  : suma de quadrats o variació total.

$SQ_{\hat{y}}$ : suma de quadrats o variació del model. Es la variació explicada.

$SQ_i$  : suma de quadrats o variació de l'harmònic  $i$ .

$SQ_e$  : suma de quadrats o variació de l'error, residual. Es la variació no explicada.

Sempre es compleix que

$$SQ_y = SQ_{\hat{y}} + SQ_e \quad i \quad SQ_{\hat{y}} \leq SQ_y \quad 6$$

D'altra banda

$$SQ_y = SQ_m + \sum_{i=1}^m SQ_i \quad 7$$

Aleshores,  $SQ_m$  representa la suma de quadrats del MESOR, o de l'harmònic 0, així 7 es pot demostrar tenint en compte que

$$SQ_i = a_i \sum y C_i + b_i \sum y C_i \quad i \text{ que}$$

$$SQ_m = SQ_0 = M \sum y \quad 8$$

Aplicant les equacions dels models lineals

$$SQ_y = y'y$$

$$SQ_y = y'y = (Xb)' Xb = b' X' Xb = b' X'y$$

$$SQ_y = y'y = \begin{bmatrix} M, a_1, b_1, \dots, a_m, b_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Sigma y \\ \Sigma y C_1 \\ \Sigma y S_1 \\ \dots \\ \Sigma y C_m \\ \Sigma y S_m \end{bmatrix} =$$

$$= M \Sigma y + a_1 \Sigma y C_1 + b_1 \Sigma y S_1 + \dots + a_m \Sigma y C_m + b_m \Sigma y S_m \quad \text{9}$$

Aplicant 4 a les fórmules 7 i 8 s'arriba

$$SQ_0 = M \Sigma y = n M^2$$

$$\begin{aligned} SQ_i &= a_i \Sigma y C_i + b_i \Sigma y S_i = n a_i^2 / 2 + n b_i^2 / 2 = \\ &= n (a_i^2 + b_i^2) / 2 = n C_i^2 / 2 \end{aligned}$$

i substituint en 9 s'arriba a

$$SQ_y = SQ_0 + \Sigma SQ_i$$

Per tal de trobar quina es la participació de cada

harmònic en la descripció del model considerem que el procés té lloc entorn del MESOR, pel que la suma de quadrats explicada pel model, sense el MESOR serà:

$$SQ\bar{y} = SQy - SQ_0$$

Així,

$100 SQ_i / SQ\bar{y}$  és el tant per cent de variació explicat per l'harmònic  $i$ .

Si  $SQ\bar{y}$  es refereix a la funció sencera es pot denominar a aquest percentatge contingut de potència i  $C_i^2$  es la potència de l'harmònic  $i$  tal com es veurà més endavant.

#### 3.3.3.4. Teorema de Parseval i espectre de potència

De 6 i 7 es dedueix que

$$SQy = SQ_0 + \sum_{i=1}^m SQ_i + SQe$$

$$SQ\bar{y} = SQ_0 + \sum_{i=1}^m SQ_i$$

Aplicant 8 tenim

$$\Sigma y^2 > M\Sigma y + \sum_{i=1}^m (a_i \Sigma y C_i + b_i \Sigma y S_i)$$

Aplicant 4

$$\Sigma y^2 \geq nM^2 + \Sigma_{i=1}^m (n a_i^2/2 + n b_i^2/2)$$

Aplicant **6**

$$\Sigma y^2 \geq nM^2 + \frac{1}{2} \Sigma_{i=1}^m C_i^2$$

Segons això:

$$\frac{1}{n} \Sigma_{i=1}^m y_i^2 \geq M^2 + \frac{1}{2} \Sigma_{i=1}^m C_i^2 \quad \mathbf{10}$$

En cas de funcions contínues :

$$\frac{1}{T} \int_0^T [f(t)]^2 dt \geq \Sigma_{i=-m}^m C_i^2 \quad \mathbf{11}$$

Generalitzant al cas d'infinits harmònics ( $m = \infty$ ) les desigualtats **10** i **11** es transformen en igualtats, i són l'enunciat del teorema de Parseval.

La majoria dels conceptes de l'anàlisi de sèries temporals, han estat pressos de la teoria d'anàlisi d'ones. Per aquesta raó es considera que **10** i **11** equivalen a la potencia mitjana que desenvoluparia un corrent elèctric de voltatge igual a la funció a través una resistència d'un ohm.

$$W = I * V = \frac{V}{R} V = V^2/R = [f(t)]^2$$

$$\bar{w} = 1/T \int_0^T [f(t)]^2 dt$$

Si  $f(t)$  fos una funció cosinusoidal, com es el cas d'un harmònic es té:

$$\begin{aligned} \bar{w}_i &= \frac{1}{T} \int_0^T C_i^2 \cos^2(\omega_i t) dt = \\ &= \frac{1}{T} \left[ \frac{t}{2} + \frac{\sin(2\omega_i t)}{4\omega_i} \right]_0^T C_i^2 = \\ &= \frac{T}{2} C_i^2 \end{aligned}$$

Per tant pot dir-se que la potència mitjana de  $f(t)$  és la suma de les potències mitjanes dels seus harmònics i que coincideixen amb la variació explicada per cada harmònic en un M.R. Per aquesta raó, la representació gràfica de les variacions explicades de tots els harmònics es coneix com a Espectre de Potència de  $f(t)$ .

### 3.3.3.5. Significació dels harmònics

Quan es fa una representació angular d'un harmònic, aquest queda definit per un punt en un quadrant dels eixos cartesianes, de coordenades  $(x_0, y_0)$  que corresponen a  $a_i, b_i$ . La línia entre l'origen de coordenades i el punt  $(x_0, y_0)$  defineix un vector que té de mòdul l'amplitud de l'harmònic i d'angle la seva fase.

Cal trobar quin és l'interval de confiança dels punts  $(x, y)$ . Aquest interval es calcula en base a l'hipòtesi de que la probabilitat de un punt qualsevol  $(x_0, y_0)$

sigui igual a  $(x_0, y_0)$  valgui una  $p$  inferior a la significació que es vol trobar.

Per tal de trobar l'interval de confiança del punt  $(x_0, y_0)$  considerarem que vé definit pel conjunt de tots els punts  $(x, y)$  que no són estadísticament diferents de  $(x_0, y_0)$ , amb  $p \leq 0.05$ .

Per calcular quins són aquests punts partirem del càlcul de la significació estadística de la hipòtesi:

$$H_0: (x_0, y_0) = (x, y)$$

La significació de la hipòtesi es calcula per una  $F$  de Snedecor

$$F = \frac{\sigma^2}{2} (H'b - b)' \left[ H' (X'X)^{-1} H \right]^{-1} (H'b - m)$$

$$\text{on } m = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}, \quad H'b = \begin{bmatrix} x_0 \\ y_0 \end{bmatrix} \quad \text{i} \quad H' (X'X)^{-1} H = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} \\ c_{21} & c_{22} \end{bmatrix}^{-1}$$

Fent

$$C = (X'X)^{-1}$$

tots els punts  $(x_0, y_0)$  continguts dins l'el·lipse son els que compleixen:

$$F_{0.95} \leq 1 / 2\sigma^2 \begin{bmatrix} x_0 - x \\ y_0 - y \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} \\ c_{12} & c_{22} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} x_0 - x \\ y_0 - y \end{bmatrix}$$



Si  $C^{-1} = E$

$$F_{0.95} \leq 1 / 2\sigma^2 \begin{bmatrix} x_0 - \bar{x} \\ y_0 - \bar{y} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_{11} & e_{12} \\ e_{12} & e_{22} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} x_0 - \bar{x} \\ y_0 - \bar{y} \end{bmatrix} \quad 12$$

E es calcula partint de E:

$$\begin{bmatrix} e_{11} & e_{12} \\ e_{12} & e_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} \\ c_{12} & c_{22} \end{bmatrix}^{-1} = \frac{1}{c_{11} c_{22} - c_{12}^2} \begin{bmatrix} c_{22} & -c_{12} \\ -c_{12} & c_{11} \end{bmatrix}$$

Els límits de l'el.lipse seràn el cas de màxima diferència no significativa, es a dir quan la desigualtat 12 sigui una igualtat. En aquest cas:

Fent  $c_0 = c_{11} c_{22} - c_{12}^2$

$$F_{0.95} 2\sigma^2 c_0 = \begin{bmatrix} x_0 - \bar{x} \\ y_0 - \bar{y} \end{bmatrix}^T \begin{bmatrix} c_{22} & -c_{12} \\ -c_{12} & c_{11} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} x_0 - \bar{x} \\ y_0 - \bar{y} \end{bmatrix}$$

$$= \begin{bmatrix} x_0 - \bar{x} \\ y_0 - \bar{y} \end{bmatrix}^T \begin{bmatrix} c_{22}(x_0 - \bar{x}) - c_{12}(y_0 - \bar{y}) \\ -c_{12}(x_0 - \bar{x}) + c_{11}(y_0 - \bar{y}) \end{bmatrix}$$

$$= c_{22}(x_0 - \bar{x})^2 - 2c_{12}(y_0 - \bar{y})(x_0 - \bar{x}) + c_{11}(y_0 - \bar{y})^2 =$$

$$= c_{22}(x_0^2 - 2x_0\bar{x} + \bar{x}^2) - 2c_{12}(x_0 y_0 - x_0 \bar{y} + \bar{x} y_0 - \bar{x} \bar{y}) + c_{11}(y_0^2 - 2y_0 \bar{y} + \bar{y}^2)$$

$$= C_{22}x^2 - 2C_{12}xy + C_{11}y^2 + 2(C_{12}y_0 - C_{22}x_0)x + \\ + 2(C_{12}x_0 - C_{11}y_0)y + C_{22}x_0^2 - 2C_{12}x_0y_0 + C_{11}y_0^2$$

que és l'equació d'una el·lipse, i es pot assimilar a

$$Ax^2 + Bxy + Cy^2 + Dx + Ey + F = 0$$

de manera que l'interval de confiança d'un harmònic ve definit per una el·lipse en la que el seu centre és  $(x_0, y_0)$  i té com a paràmetres

$$A = C_{22} \quad B = -2 C_{12} \quad C = C_{11}$$

$$D = 2(C_{12}y_0 - C_{22}x_0) \quad E = 2(C_{12}x_0 - C_{11}y_0)$$

$$F = C_{22} x_0^2 - 2C_{12}x_0y_0 + C_{11}y_0^2 - 2\sigma^2 F_{0.95} (C_{11}C_{22} - C_{12}^2)$$

$$\sigma^2 = \frac{SQe}{n-2m-1}$$

Els valors dels radis o eixos de l'el·lipse són  $R_a$  i  $R_b$

on,

$$R_a = 2a = - \frac{C_3}{C_1} \quad i \quad R_b = 2b = - \frac{1}{R_a}$$

on,

$$C_3 = \frac{A_0}{A_3} \quad i \quad C_1 = \frac{A + C + W}{2}$$

$$A_0 = ACF - 1/4 (D^2C + E^2A + B^2F - BDE)$$

$$A_3 = AC - B^2/4$$

$$W = ((A-C)^2 + B^2)^{1/2}$$

L'angle que mantenen els eixos de la el.lipse amb els eixos cartesianes val:

$$\alpha = \frac{1}{2} \operatorname{atg} \frac{B}{A-C}$$

### 3.3.4. ANALISI DE L'EVOLUCIO DE PARAMETRES MOTORS

S'han definit dues funcions matemàtiques per tal d'ajustar les corbes de l'evolució dels diferents paràmetres del ritme, AMT, CPH1 i CPH8, a una equació. Això permet quantificar la tendència de les dades obtingudes d'una manera força exacte. El procediment de càlcul va fer-se pel mètode iteratiu simplex (Nash).

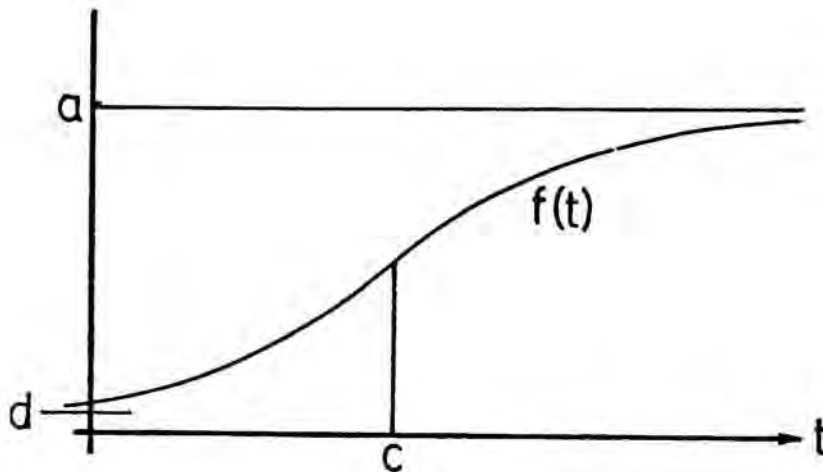
#### 3.3.4.1. Funció d'ajust per al CPH1

La corba de l'evolució del CPH1 en el temps, ha estat ajustada a una funció de tipus sigmoide. La idea per definir aquesta funció va sorgir de l'observació visual de com evoluciona en CPH1 en el temps.

El CPH1 augmenta amb el temps però a partir d'un cert dia el valor de CPH1 es manté constant fins al final del registre adquirint un valor asimptòtic.

Les característiques que ha de tenir la funció d'ajust a la corba d'evolució són:

- 1- Tenir pel cantó dret una asimptota paral·lela a l'eix X amb un valor més elevat que el valor de la funció a temps 0 ( $t_0$ ).
- 2- No pot prendre valors negatius a partir de  $t_0$ .
- 3- Ha d'haver un punt d'inflexió entre  $t_0$  i  $+\infty$
- 4- Probablement presenta una asimptota paral·lela a l'eix X pel cantó esquerra, amb un valor proper al de la funció a  $t_0$ .



La funció que es va adoptar va ser una funció de tipus arctangent, depenent de 4 paràmetres:

$$Y = \frac{a-d}{\pi} (\text{atg} (|b|(x-c)) + \pi/2) + d$$

p(1) = a = asymptota superior o valor màxim de la funció

p(2) = b = factor de desplaçament de la funció sobre l'eix x

p(3) = c = punt d'inflexió de la funció

p(4) = d = asymptota inferior o valor mínim de la funció

#### 3.3.4.1.1. Significació dels paràmetres de la funció

p(1): És l'asimptota a que tendeix la funció. Aquest valor es sempre positiu. Més que el seu valor en sí, l'interès que té és la relació d'aquests entre animals. Obviament, un valor de CPH1 mai podrà ser superior al 100%. En els casos en que ha donat una asimptota

superior a 100 cal pensar en que amb els dies de registre no n'hi ha prou per arribar a una estabilitat en quant al contingut de potència.

p(2): Aquest paràmetre es el factor de desplaçament. En el cas del CPH1 s'ha pres com a valor absolut per tal que el pendent de la corba en el punt d'inflexió sigui positiu, es a dir per que la corba vagi sempre de l'asíptota més baixa a l' asíptota superior. Per aquest motiu la funció de correlació pel CPH8 no porta l'operador absolut en el valor de b. Els valors més elevats de b indiquen que en el punt d'inflexió el pendent és superior, és a dir més pronunciat.

p(3): Indica el dia en que es produeix el punt d'inflexió de la corba. Un valor negatiu té significat més teòric que real ja que representa un temps abans del desalletament.

p(4): Indica el valor mínim que pot adquirir la funció. Aquest valor correspon als primers dies de registre.

#### 3.3.4.2. Funció d'ajust pel CPH8

S'observa com l'evolució del CPH8 amb el temps és inversa a la del CPH1, per aquest motiu s'ha ajustat a una funció sigmoide, inversa a la utilitzada per a la evolució del CPH1, que presenta valors més elevats al principi i va disminuint posteriorment. La funció de regressió utilitzada ha estat la mateixa que per l'evolució del CPH1 però permetent que el factor b prengués valors negatius, es a dir sense el valor absolut.

##### **3.3.4.2.1. Significació dels paràmetres de la funció**

Els valors dels paràmetres de la funció, s'interpreten de la següent manera.

p(1): Aquest paràmetre indica el contingut de potència

màxim d'aquest harmònic que pot assolir un animal determinat. En aquest cas té molt més sentit el prendre l'ordinada en l'origen com a valor inicial del CPHB, en lloc del  $p(1)$ .

$p(2)$ : Els valors més negatius de  $b$  indiquen que en el punt d'inflexió el pendent es superior, es a dir més pronunciat.

$p(3)$ : Indica el dia en que es produeix el punt d'inflexió de la corba. Un valor negatiu té significat més teòric que real ja que representaria abans del desalletament.

$p(4)$ : Indica el valor mínim al que tendeix la funció.

#### 3.3.4.3. Funció d'ajust per l'AMT

La corba de l'evolució de l'activitat motora, s'ha ajustat a una funció gaussiana, que hem denominat "normal invertida", que compleix les característiques de l'hipòtesi a demostrar. Aquesta consistia en trobar si es produïa una disminució en l'activitat motora en uns dies concrets de la vida de la vida de l'animal i una posterior recuperació als nivells inicials. Les característiques que ha de tenir la funció són:

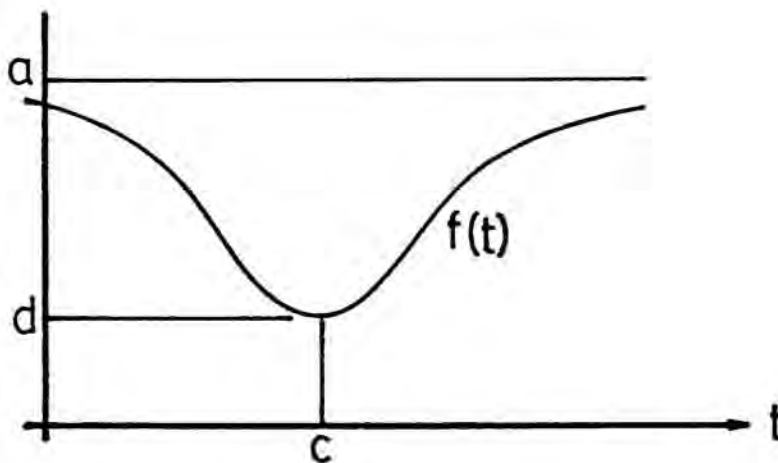
- 1- Ha de tenir un mínim a partir de  $t_0$ .
- 2- Un cop superat el mínim ha de tendir a un valor asimptòtic.
- 3- El valor de la funció a  $t_0$  pot ser inferior a l'asímtota o molt pròxim a ella.
- 4- La funció no pot presentar valors negatius a partir de  $t_0$ .

Així doncs la corba d'ajust de l'evolució de l'activitat motora és una funció depenent de 4 paràmetres que

cumpleix l'equació:

$$Y = a(a-d) * e^{(-b(x-c)^2)}$$

i que s'esquematitza en la figura:



on, els paràmetres són:

P(1) = a = Asíptota o valor màxim de la funció.

P(2) = b = Factor de desplaçament de la corba sobre l'eix X.

P(3) = c = Punt en el que el valor de la funció es mínim.

P(4) = d = Valor mínim de la y, en el mínim de la funció.



### 3.3.4.3.1. Significat dels paràmetres de la funció

p(1): Representa el valor màxim que pot adquirir la funció. Es un valor asimptòtic i no pot prendre valors negatius.

p(2): Representa el factor de desplaçament. En la funció es prèn el valor absolut per evitar que puguin apareixer inflexions en sentit oposat al desitjat. Mentre més baix sigui aquest paràmetre més suau serà el pendent de la corba en la baixada, i posterior pujada, de l'activitat motora.

p(3): Representa el punt en que la funció val el mínim. Valors negatius d'aquest paràmetre no es tenen en compte ja que, teòricament, indicarien temps abans del registre i no tenen cap significat.

p(4): Es el valor mínim de la funció. Es resta del valor asimptòtic ja que els valors de la funció han de quedar compressos entre els dos valors. Valors negatius d'aquest paràmetre no tenen sentit pel que no es tindran en compte.

L'ordinada en l'origen es important a tenir en compte, ja que representa el valor inicial d'activitat motora de l'animal. En molts cassos coincideix amb el valor màxim o asimptòtic de la funció, es a dir amb el p(1).

### 3.3.5. ESTADISTIC A

#### 3.3.5.1. Definició

L'estadistic A ha estat expressament ideat per a quantificar un patró de conducta determinat en l'evolució del ritme dels animals i per trobar la significació estadística d'aquest patró.

#### 3.3.5.2. Càlcul de l'estadistic A

El càlcul de l'estadistic s'ha realitzat mitjançant el següent procediment:

De cada animal es disposen de dues sèries de N termes cadascuna. Una sèrie correspon als valors d'activitat motora i l'altra als de CPH1 diaris. Els N dies són els dies de registre. S'ha calculat el valor mitjà d'activitat motora diària dels N dies i el valor mitjà del CPH1.

El patró de conducta a estudiar, corresponent a la nostra hipòtesi de treball, té 4 situacions classificades segons aquest criteri: 1) Una primera situació corresponent a l'inici de l'aïllament en que l'activitat motora és superior a la mitjana i el CPHC és inferior a la mitjana. 2) La segona situació correspon a valors tant d'activitat com de CPHC inferiors a les mitjanes respectives, que representaria el principi del descens d'activitat abans de la aparició del ritme circadiari. 3) la tercera fase correspondria a l'aparició del ritme circadiari quan encara està disminuïda l'activitat motora i ve donada per un valor d'activitat inferior a la mitjana i un CPHC superior a la mitjana. 4) per últim, la quarta situació correspondria a l'animal adult on ja està el ritme establert i tant els valors d'activitat com del CPHC són superiors a la mitjana.

El criteri que es va seguir a continuació va ser el següent: quan el valor d'activitat diari es superior a la mitjana d'activitat es dona un valor d'1 i quan és

inferior es dona el valor 0. Per altre banda, en la sèrie de valors de CPH1 es segueix el mateix procediment, quan el CPH1 diari és superior al CPH1 mitjà es dona el valor 1 i quan es inferior el valor 0.

Així els 4 tipus de situacions, resultat de totes les combinacions possibles entre els dos valors de les dues sèries, venen representades per 4 tipus de parelles de dades, que es representen per:

tipus	1	2	3	4
AMT	1	0	0	1
CPHC	0	0	1	1

Aquest esquema mostra l'ordre de l'aparició de les diferents situacions en el model hipotètic de conducta.

Lògicament cada un d'aquest tipus de situació es pot repetir  $n$  vegades i es tindran 4 valors de  $n_i$ , ( $i=1,2,3,4$ ), on cada  $n_i$  representa el # d'observacions en la sèrie del tipus  $i$ . Si la sèrie de dades s'hagués desenvolupat estrictament segons la hipòtesi, la situació teòrica seria:

$$\begin{matrix} n_1 & n_2 & n_3 & n_4 \\ [...] & [...] & [...] & [...] \end{matrix}$$

Cada un d'aquests segments,  $n_i$ , té el seu centre teòric que es defineix com a  $C_i$ .

Els valors dels centres teòrics tindran els següents valors:

$$C_1 = 1/2 (n_1+1)$$

$$C_2 = n_2 + 1/2 (n_2+1)$$

$$C_3 = n_1 + n_2 + 1/2 (n_3+1)$$

$$C_4 = N - 1/2 (n_4+1)$$

El procediment a seguir consisteix en determinar per a cada un dels N dies el tipus a que pertany i calcular quants  $n_i$  hi ha en tota la sèrie. A continuació es calcula el centre teòric de cada segment segons els  $n_i$ . Per últim cal calcular quines son les desviacions dels elements de cada tipus als seus centres respectius en la sèrie teòrica i en la real.

L'estadistic A es el resultat de dividir la desviació real per la teòrica.

El càlcul de l'estadistic A s'ha realitzat mitjançant l'algoritme que s'indica a continuació.

#### 3.3.5.2.1. Algoritme pel càlcul de l'estadistic A

L'algoritme consta basicament de dues parts, en la primera (passos de l'1 al 4) es troba el tipus de situació a que correspón cada dia de la sèrie i la posició de cada tipus dins la sèrie. En la segona (passos del 5 al 10) es calculen els centres teòrics i les desviacions reals i teòriques.

En les línies de l'algoritme, després del símbol ":", s'escriuen les explicacions corresponents.

Passos    Descripció

- 1    Entrada de dades  
 Entrar N ?# de dies de la sèrie.  
 Entrar A(I), I=1,2,...,N ?valors d'activitat motora.  
 Entrar B(I), I=1,2,...,N ?valors de CPH12.  
 Càlcul de les mitjanes d'activitat, A, i de Contingut de potència, B.  
 M=0, A=0, B=0 ? M és el nombre de dies del registre  
 Per I= 1 fins a N, si A(I)>0, fer A=A+A(I), B=B+B(I), M=M+1. Acabar el cicle d'I.  
 A=A/M, B=B/M.
- 3    Càlcul del tipus, T, de cada dia de la sèrie.  
 Per I=1 fins a 4, inicialitzar N(I)=0, S(I)=0, Q(I)=0. Acabar el cicle d'I.  
 Per I=1 fins a N  
     Si A(I)=0 fer T=0. Anar al pas 4 ? quan no hi ha valor d'activitat en el dia I  
     Si A(I)>A i B(I)<B, fer T=1. Anar al pas 4  
     T=2-(A(I)>A)-(B(I)>B)
- 4    Càlcul del nombre de dades de cada tipus, N(T), de la suma de les posicions, S(T) i de la suma de quadrats de les posicions de cada tipus, Q(T). Assignació del tipus al dia de la serie, C(I).  
     N(T)=N(T)+1, S(T)=S(T)+I, Q(T)=Q(T)+I\*I, C(I)=T  
 Acabar el cicle de I.
- 5    K=0, NU=0, DE=0 ? NU i DE són el numerador i denominador de l'estadístic  
 Per I=1 fins a 4, S=0, Q=0 ? Càlcul de les desviacions reals i teòriques.  
     Si N(I) =0 anar al pas 10 ? quan no hi ha dades del tipus I.
- 6    Per J=1 fins a N(I) ? per cada un dels valors dels diferents tipus
- 7    K=K+1 ? on K es la posició de cada tipus  
     Si C(K)=0, torna al pas 7 ? no hi ha cap tipus en aquesta posició.
- 8    Càlcul de les sumes i sumes de quadrats de les N(I) posicions teòriques  
     S=S+K, Q=Q+K\*K  
 Acabar el cicle de J

- 9             $M=N(I)$   
              Càlcul del centre teòric C  
               $C=S/M$   
              Càlcul de les desviacions reals i teòriques de  
              cada tipus i acumulades en NU i DE respectivament  
               $DE=DE+C*(C*M-2*S)+Q$   
               $NU=NU+C*(C*M-2*S(I))+Q(I)$
- 10          Acabar el cercle de les I
- 11          Càlcul de l'estadístic A  
               $A= NU/DE$

### 3.3.5.3. Distribució de l'estadístic A

Per tal de trobar la distribució de l'estadístic A s'han generat més de 25000 series aleatòries de N elements amb els nombres 1,2,3,4, calculant el valor corresponent d'A i la seva freqüència global d'aparició de cada un dels seus valors. Els valors utilitzats de N han estat 28 i 45 ja que són els corresponents a les sèries reals de l'experiment. 28 dies pels animals de la família "1" i 45 dies pels demés animals.

### 3.3.5.4. Significació de l'estadístic A

La taula de probabilitats d'aparició d'una sèrie determinada segons el valor d'A, es va determinar calculant l'àrea sota la corba de la funció empírica. La taula de probabilitats dels diferents valors d'A es mostra a continuació.

Significació de l'estadístic A		
p (%)	28 dies	45-dies
1	9.25- 9.50	10.00-10.25
2	10.50-10.75	11.25-11.50
5	12.75-13.00	13.50-13.75
10	14.75-15.00	15.50-18.50
20	17.50-17.75	18.15-18.50

### 3.3.6. DISTRIBUCIO i TEST XI QUADRAT

Si  $y_1, \dots, y_m$  son variables aleatòries independents que segueixen una normal  $N(0,1)$ , llavors la variable:

$$X_m^2 = Y_1^2 + \dots + Y_m^2$$

es diu que es la variable aleatòria amb distribució  $\chi^2$  amb  $m$  graus de llibertat.

Aquesta funció es absolutament continua amb funció de densitat

$$f(x) = \frac{2^{-(m/2)}}{\Gamma(m/2)} e^{-(x/2)} x^{(m/2)-1} \quad \text{si } x > 0$$

$$f(x) = 0 \quad \text{si } x \leq 0$$

Les propietats fonamentals de la distribució són:

- 1)  $E(X_m^2) = m$   
 $\text{var}(X_m^2) = 2m$
- 2) Si  $X_m^2$  i  $X_n^2$  són estocàsticament independents amb  $m$  i  $n$  graus de llibertat respectivament, llavors

$$X_{m+n}^2 = X_m^2 + X_n^2$$

La suma de dues  $\chi^2$  es un altre  $\chi^2$  amb graus de llibertat suma dels graus de llibertat dels dos  $\chi^2$  inicials.

El test  $\chi^2$  quadrat permet realitzar proves d'independència en taules de contingència (quan una població admet diferents descomposicions en successos excluints), i tests d'homogeneïtat que permeten conèixer si les probabilitats dels diferents successos son homogenies en les diferents poblacions.

En aquests dos casos, la hipòtesi nula es prova per (223):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

on,  $O_{ij}$  = nombre observat de casos classificats en la fila  $i$  i columna  $j$  de la taula de contingència.

$E_{ij}$  = nombre de casos esperats segons  $H_0$  que classificaràn en la fila  $i$  columna  $j$ .

Els valors de  $\chi^2$  es distribueixen segons una  $\chi^2$  quadrat amb  $(r-1)(k-1)$  graus de llibertat.

$r$  = nombre de files

$k$  = nombre de columnes de la taula

La freqüència esperada en cada cas es calcula multiplicant els totals marginals de la casella concreta de la taula i dividint per  $N$  (nombre total de dades).

### 3.3.7. TEST DE LA PROBABILITAT EXACTA DE FISHER

Aquest test s'utilitza per conèixer la probabilitat d'un succés en el cas de taules de contingència de  $2 \times 2$ , amb freqüències inferiors a 5.

La probabilitat exacta d'observar un conjunt de freqüències en una taula  $2 \times 2$  quan els totals marginals es consideren fixes ve donada per la fórmula (Siegel):

$$p = \frac{(A+B)! (C+D)! (A+C)! (B+D)!}{N! A! B! C! D!}$$

Si la freqüència més petita és superior a 0 cal calcular la probabilitat de les possibles taules amb freqüències inferiors. La probabilitat final serà la suma de totes les probabilitats.



### 3.3.8. MÈTODES MULTIVARIANTS

Els mètodes d'anàlisi multivariant s'han fet servir per estudiar els diferents grups d'animals atenent a les característiques de tot l'espectre en el seu conjunt o bé a vàries respostes de diferent naturalesa de forma simultània.

Atenent a aquestes característiques en conjunt, aquests mètodes s'han utilitzat per :

- Diferenciar famílies, individus, generacions i sexes.
- Classificar individus segons la seva proximitat
- Definir grups segons les característiques dels patrons circadianis.
- Establir la relació entre pares i fills.

S'han assajat diferents tècniques per tal de trobar la més adequada al nostre cas, ja que en aquest camp no ens consta que existeixi cap tècnica específica.

A continuació es mostra la classificació de les tècniques utilitzades.

- Anàlisi multivariant de la varianga
- Anàlisi de components principals
- Anàlisi de distàncies euclídiades
- Anàlisi discriminant
- Mètodes de classificació
  - Agregació d'elements
    - Agregació ascendent jeràrquica
      - Mètode de la mínima perdua d'inèrcia
      - Construcció del dendograma
    - Agregació no jeràrquica
      - Atracció gravitatoria
      - Atracció gravitatoria amortida
  - Funcions de classificació

En l'explicació dels mètodes, s'exposen les fórmules utilitzades per a fer els càlculs sense aprofundir gaire en consideracions teòriques, excepte en el mètode d'agregació per atracció gravitatòria, ja que en aquest cas es tracta d'un mètode original.

### 3.3.8.1. Anàlisi multivariant de la variança (MANOVA)

El plantejament és idèntic al de l'anàlisi del model linial univariant, amb la diferència que el que abans eren vectors ara són matrius. Així, es planteja:

$$Y = XB + E$$

on, Y és la matriu de respostes (n\*p)  
 X és la matriu de disseny (n\*m)  
 B és la matriu de paràmetres (m\*p)  
 E és la matriu d'error (n\*p)  
 n és el nombre d'observacions  
 p és el nombre de respostes i  
 m és el nombre de variables

L'estimació dels paràmetres es fa a partir de l'equació normal

$$X'XB = X'Y$$

$$B = (X'X)^{-1} X'Y$$

La matriu d'errors quadràtics es calcula fent:

$$Qe = Y'Y - Y'XB$$

Tal com es feia en el model linial univariant, es pot plantejar una hipòtesi linial en base als paràmetres, fent:

$$H_0: H'B = M$$

on,  $H$  és la matriu de la hipòtesi ( $m \times h$ )  
 $B$  és la matriu de constants ( $h \times p$ )  
 $M$  és la matriu de constants ( $m \times p$ )  
 $h$  és el nombre de columnes de la hipòtesi

Llavors, es calcula la matriu d'error deguda a la hipòtesi fent:

$$Qh = (H'B - M)' \left[ H'(X'X)^{-1}H \right]^{-1} (H'B - M)$$

Que en el cas que  $M = 0$

$$Qh = B'H \left[ H'(X'X)^{-1}H \right] H'B$$

A diferència del model lineal univariant, la significació de la hipòtesi es determina mitjançant el càlcul de la Lambda de Wilks (Cuadras)

$$= \frac{|Qe|}{|Qe - Qh|}$$

La probabilitat associada a la Lambda es calcula fent la transformació de Rao (41) d'un valor aproximat d' $F$ .

$$v = \left( -1/b - 1 \right) \frac{v_2}{v_1}$$

on,  $v$  és  $\approx F$  amb  $v_1, v_2$  graus de llibertat

$$v_1 = p * h$$

$$v_2 = 1/2 (b (2n - 2m + h - p - 1) - v_1) + 1$$

$$b = \frac{p^2 h^2 - 4}{p^2 + h^2 - 5}$$

### 3.3.8.2. Anàlisi de components principals

L'anàlisi per components principals s'ha utilitzat per a reduir el nombre de respostes a un nombre limitat de 2 o 3 components que, essent una combinació lineal de les respostes originals, mantenen un elevat tant per cent de la seva informació i fan més fàcil el càlcul i permeten la representació dels individus en el plà.

El problema consisteix en trobar la matriu que transforma les dades originals en els components principals (139) segons:

$$Z = YA$$

on, Z és la matriu de components principals (n\*p)

Y és la matriu de respostes (m\*p)

A és la transformació lineal (p\*p)

Les columnes de Z queden ordenades per ordre d'importància, de manera que la primera és el component que explica més variació, seguit de la segona, etc. En el nostre cas, s'han agafat els dos primers components. Això suposa la projecció del núvol de punts en el plà.

La matriu A, està constituïda pels vectors propis que resulten de diagonalitzar la matriu X'X de manera que:

$$X'X = A' \Lambda A$$

$$= \text{dia} ( \lambda_1, \lambda_2, \dots )$$

on els valor propis  $\lambda_1, \lambda_2, \dots$  són el quadrat de la

variació explicada pels components corresponents.

Un cop calculada  $Z$ , es poden aplicar directament els mètodes de l'anàlisi multivariant de la variança.

### 3.3.8.3. Anàlisi de distàncies euclídiades

Aquest mètode té una certa semblança a l'anterior (cuadras). Bàsicament consisteix en calcular les distàncies entre tots els punts, en el seu espai original i després reduir les dimensions projectant el núvol de punts, ja sigui en un pla o en un espai de tres dimensions, de manera que es mantinguin al màxim les distàncies originals.

Per tal de fer això, cal començar amb el càlcul de la matriu de quadrats de les distàncies fent:

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^p (y_{ik} - y_{jk})^2$$

La matriu  $C$  que conté les coordenades de la nova projecció està constituïda pels vectors propis que resulten de la diagonalització de la matriu  $G$ :

$$C = G' G$$

$$G = -1/2 FDF$$

$$F = I_p - \frac{1}{p} E_p E_p'$$

on,  $I_p = \text{dia}(1, 1, 1, \dots)$ ,  $(p \times p)$

$$E_p = [1, 1, \dots]^T, \quad (p \times 1)$$

Els vectors de  $C$  queden ordenats per ordre d'importància, indicant els seus valors propis associats, la quantitat de variació que contenen en base a les distàncies originals. Per a les representacions gràfiques s'han utilitzat les dues primeres dimensions.

#### 3.3.8.4. Estudi de la proximitat

Per a determinar el grau de proximitat dels elements d'un grup determinat de punts s'han seguit les dues tècniques estadístiques que es descriuen a continuació. Per a la seva descripció considerarem un grup format per  $l$  elements identificats pels números  $1, 2, \dots, l$ .

##### 3.3.8.4.1. Càlcul dels centroides i de les el·lipses

El problema s'ha restringit a l'anàlisi de la projecció de les distàncies en dues dimensions, que per a simplificar designarem  $x$  i  $y$  (no confondre amb les  $X$  i  $Y$  de la teoria precedent). D'aquesta manera queden definits els punts  $(x_i, y_i)$ ,  $i = 1, 2, \dots, l$ .

Els centroides corresponen a les mitjanes de cada dimensió:

$$x_c = \bar{x} = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l x_i$$

$$y_c = \bar{y} = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l y_i$$

Els radis de les el·lipsses són

$$r_x, r_y = K \left[ S_x + S_y \pm \left[ (S_x + S_y)^2 - 4 (S_x S_y - S_{xy}^2) \right]^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$\text{on, } S_x = \Sigma x^2 - \frac{1}{1} \Sigma^2 x$$

$$S_y = \Sigma y^2 - \frac{1}{1} \Sigma^2 y$$

$$S_{xy} = \Sigma xy - \frac{1}{1} \Sigma x \Sigma y$$

El valor de K depèn de l'interval que es vulgui considerar:

$$\text{Interval de confiança: } K^2 = \frac{1}{1(1-2)} F$$

Conté el centre de la població amb un 95% de probabilitat.

$$\text{Interval de tolerància: } K^2 = \frac{1+1}{1(1-2)} F$$

Conté el 95% de la població.

$$\text{Error típic: } K^2 = \frac{1}{1(1-2)}$$

Es indicador de la variabilitat del centre de la mostra.

$$\text{Desviació estandar: } k^2 = \frac{1}{1-2}$$

Es indicador de la variabilitat dels punts de la mostra

Els pendents dels eixos es calculen fent:

$$b_x, b_y = \frac{S_y - S_x}{2S_{xy}} \pm \left[ 1 + \left[ \frac{S_y - S_x}{2S_{xy}} \right]^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

#### 3.3.8.4.2. Variança entorn els centroides

Per a calcular la dispersió dels punts entorn el seu centroide s'ha calculat la seva variança respecte el centroide en base als quadrats de les seves distàncies euclídiades. Aquesta variança l'hem anomenat  $V_c$

$$\begin{aligned} V_c &= \frac{1}{1-2} \frac{1}{i=1} \left[ (x_i - x_c)^2 + (y_i - y_c)^2 \right] \\ &= \frac{1}{1-2} \left[ \Sigma x^2 - \frac{1}{1} \Sigma^2 x + \Sigma y^2 - \frac{1}{1} \Sigma^2 y \right] \end{aligned}$$

Això es pot generalitzar a p dimensions fent:



$$\begin{aligned}
 V_c &= \frac{1}{p(1-2)} \sum_{i=1}^1 \sum_{j=1}^p (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \\
 &= \frac{1}{p(1-2)} \sum_{j=1}^p \left[ \sum X_{.j}^2 - \frac{1}{1} \sum^2 X_{.j} \right]
 \end{aligned}$$

El coneixement de la  $V_c$  permet conèixer com canvia la variabilitat d'un grup de paràmetres segons el grup d'animals considerat, que poden estar formats per les diferents generacions.

### 3.3.8.5. Anàlisi discriminant

Es pot considerar una variant del MANOVA (139) on les respostes s'han substituït per variables binàries (1 o 0) que indiquen la pertinença a un grup o altre d'animals, i les variables del model són el que abans eren les respostes. D'aquesta manera, es tracta de predir la pertinença a un grup en base a les respostes observades.

Quan es tracta de diferenciar entre dos grups (com és el cas del sexe) es pot tractar com un problema univariant, on la resposta valdrà únicament 1 o -1. Els coeficients de correlació de les variables respecte la resposta binària indicaran el grau d'importància que té la variable considerada per a la diferenciació de grups.

Els paràmetres del model defineixen una combinació lineal de les variables, que permeten estimar la resposta. Aquests paràmetres són doncs, la funció discriminant propiament dita.

La significació de la funció discriminant es pot calcular estudiant la possibilitat de que tots els seus

paràmetres siguin nuls, amb la matriu d'hipòtesi:

$$H = I_p$$

### 3.3.8.5. Mètodes de classificació

Amb aquests mètodes es tracta de trobar alguna llei sistemàtica que permeti un agrupament dels elements segons la semblança de les seves característiques individuals. Després d'aplicar cada mètode es tractarà de comprovar si l'agrupament realitzat coincideix o indica alguna característica generacional o familiar.

#### 3.3.8.5.1. Agregació d'elements

En aquest cas, l'agrupament es fa segons uns procediments específics, sense tenir en compte el grup de procedència dels elements. D'aquesta manera l'agrupament es fa, sense cap perjudici, únicament en base a les característiques del patró circadiari.

Els procediments utilitzats són de tipus algorítmic i no fan us de càlculs formalitzats com es fa habitualment en altres tipus d'anàlisi. Es realitzen una sèrie d'operacions recursives i repetitives que duen a la solució final. Això fa que aquests mètodes siguin del tot dependents de l'us de l'ordinador (139, 220).

##### 3.3.8.5.1.1. Agregació jeràrquica

La tècnica que s'ha emprat pertany a les anomenades d'agregació ascendent o aglomerativa, les quals procedeixen de la construcció de les classes per l'aglomeració successiva d'objectes dos a dos, resultant una jerarquia de la partició d'objectes.

Bàsicament, l'algoritme consta de les següents etapes:

- 0 - Es disposa d' $n$  elements a classificar.
- 1 - Es busca el parell d'elements més pròxims i s'agreguen en un nou element
- 2 - Es calculen les distàncies entre el nou element i la resta.  
Es torna a estar en les mateixes condicions que a l'etapa 1, però amb un element menys.
- 3 - Es repeteixen els passos 2 i 3 fins que tant sols resti un element.

#### 3.3.8.5.1.1.1. Mètode de la mínima perdua d'inèrcia

En aquesta tècnica (Lebart) en lloc de buscar els elements més pròxims, es busquen aquells punts que la seva agregació comporti la mínima perdua d'inèrcia, el que porta a considerar  $I$  com a nou index de dissimilitud.

El mètode s'ha aplicat als punts projectats en el pla, pel que les distàncies entre ells es calculen fent:

$$d_{ij}^2 = (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2$$

La posició d'un element resultant de l'agregació d'altres dos, es determina per les seves coordenades  $x$  i  $y$ .

$$x = \frac{n_i x_i + n_j x_j}{n_i + n_j}$$

$$y = \frac{n_i y_i + n_j y_j}{n_i + n_j}$$

on  $n_i$  i  $n_j$  són el nombre d'elements agregats (massa) que contenen els elements  $i$  i  $j$ .

La massa del nou element serà doncs  $n = n_i + n_j$ .

La variació d'inèrcia deguda a l'agregació serà:

$$I_{ij} = \frac{n_i n_j}{n_i + n_j} d_{ij}^2$$

A continuació es descriu l'algoritme complet per a dur a terme aquesta classificació.

### 3.3.8.5.1.1.1. Algoritme de classificació

#### Passos Descripció

- 1 Entrar la matriu  $P(n \times p)$  ' Conté les  $p$  coordenades dels  $n$  elements. Inicialment, la columna 0 conté el nombre d'individus de cada element.
- 2 Localització del parell d'elements que donen la mínima variació d'inèrcia (VDI).  
Per  $i=2$  fins a  $n$  ' Repàs des del segon element a l'últim.  
Per  $j=1$  fins a  $i$  ' comparació amb  $i$  dels seus elements precedents.  
Càlculs de la distància entre els elements  $i$  i  $j$ .  
 $D_{ij}=0$  ' és la distància al quadrat.  
Per  $k=1$  fins a  $p$  ' són les  $p$  dimensions  
 $D_{ij} = D_{ij} + (P_{ik} - P_{jk})^2$   
Tancar el cicle de  $k$   
 $D_{ij} = D_{ij} / (1/P_{i0} + 1/P_{j0})$  ' és la variació d'inèrcia al ajuntar-se els elements.  
Si  $D_{ij} < D_0$ , llavors  $D_0 = D_{ij}$ ,  $i_0 = i$ ,  $j_0 = j$  ' guarda els elements  $i$  i  $j$ .  
Tancar el cicle de  $j$

- Tancar el cicle de i.
- 3 Càlcul de les coordenades del nou element.  
 $P_{i0,i} + P_{j0,0}$  ' és el nombre d'individus  
 Per  $i=1$  fins a  $n$  ' són les  $n$  coordenades.  

$$D_i = (P_{i0,i} * P_{i0,0} + P_{j0,i} * P_{j0,0}) / D_0$$
 ' guarda provisionalment.  
 Tancar el cicle d'i  
 $E\$_0 = E\$_{i0} + "-" + E\$_{j0}$  ' construcció de la nova cadena d'individus.
- 4 Reordenació dels nous elements. Es treuen els elements agrupats i s'afageix el nou al final.  
 $n = n-1$  ' càlcul del nou nombre d'elements  
 $k = 0$  ' indicador de la posició dels elements vells de la matriu.
- 5 Per  $i=1$  fins a  $n-1$  ' són les posicions dels nous elements.  
 $k=k+1$  ' incrementa l'indicador de posició dels elements vells.  
 Si  $k=i_0$  ó  $k=j_0$  anar al pas 5. ' No cal tenir-ho en compte.  
 Passa les dades de la posició vella a la nova.  
 per  $j=1$  fins a  $p$   

$$P_{ij} = P_{kj}$$
  
 Tancar el cicle de j  
 $E\$_i = E\$_k$   
 Tancar el cicle de i.
- 6 Passa les dades del nou element a la fila p (l'última).  
 Per  $j=1$  fins a p  

$$P_{nj} = D_i$$
  
 Tancar el cicle d'i.  
 $E\$_n = E\$_0$
- 7 Imprimir  $E\$_0$  i  $D_0$  ' Sortida parcial de resultats.
- 8 Si  $m>1$  anar al pas 2 ' encara queden elements per agregar.

### 3.3.8.5.2.2. Construcció del dendograma

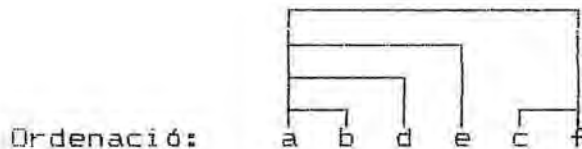
Per tal de visualitzar el procés d'agregació s'ha dibuixat, sobre la projecció dels punts en el pla, les

linies que van unint successivament els elements. Aquest esquema resulta confús i de difícil interpretació, el que ha fet necessària la construcció d'un arbre de classificació o dendograma de la manera que s'exposa a continuació.

Es disposen els elements en una ordenació de manera que es permeti el seu agrupament de forma uniforme, tal com s'indica a l'exemple.

Elements: a, b, c, d, e, f

Agrupaments: a-b  
 c-f  
 (a-b)-d  
 (a-b-d)-e  
 (a-b-d-e)-(c-f)



A l'eix vertical els elements es disposen de manera que la distància entre els successius nivells d'unió sigui proporcional a les variacions d'inèrcia. Des del punt de vista pràctic és més fàcil fer primer la ordenació i començar a representar els elements pel final de la classificació.

### 3.3.8.5.3. Agregació no jeràrquica

En aquesta tècnica els elements es mouen tots alhora per agrupar-se en nuclis. A diferència de les agregacions jeràrquiques no es produeix l'agrupament successiu i ordenat dels elements, sino que ho fan tots alhora. Existeixen gran quantitat d'algoritmes que reben el nom de núvols dinàmics (18, 139, 220).

En algunes d'aquestes tècniques es fixa prèviament el nombre de nuclis que s'han de formar. En el nostre cas, això no s'ha fet precisament per a evitar prejudicis en la classificació, degut a que no tots els espectres mitjans dels animals provenien d'un mateix nombre de dies de registre, i per que l'agregació es faci exclusivament per les relacions degudes a la semblança dels paràmetres dels elements.

### 3.3.8.5.3.1. Agregació gravitatòria

Es suposa que cada punt o element està sotmès a l'atracció gravitatoria de tots els altres. Segons això la força que actua sobre l'element i deguda a la presència de j és :

$$F_{ij} = K \frac{m_i m_j}{d_{ij}^2}$$

on, K és una constant

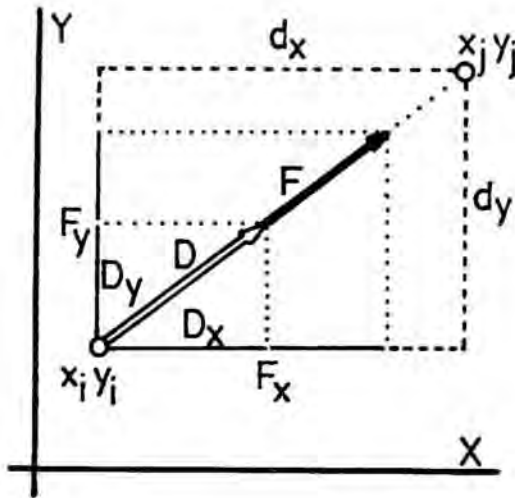
$m_i$  i  $m_j$  són les masses dels elements

$d_{ij}^2$  es calcula segons la fórmula utilitzada en el mètode anterior

Com que tots els elements tenen la mateixa massa i aquesta és un valor constant, per facilitar els càlculs s'estableix que  $K_{mimj}$  valgui 1 amb el que tenim

$$F_{ij} = \frac{1}{d_{ij}^2}$$

Per determinar els components ortogonals, utilitzant una notació simplificada ( $F = F_{ij}$ ,  $d_{ij}^2 = d^2$ ), es farà:



on,  $d_x = x_j - x_i$   
 $d_y = y_j - y_i$

$$\frac{F}{d} = \frac{F_y}{d_y} = \frac{F_x}{d_x}$$

per tant

$$F_x = \frac{d_x}{d} F = \frac{d_x}{d^3}$$

$$F_y = \frac{d_y}{d} F = \frac{d_y}{d^3}$$

Com que l'element i està subjecte a l'atracció dels \$n-1\$ elements restants, la Força resultant que actua sobre ell serà:



$$F_i = \sum_{j=1}^n F_{ij} \quad (j \neq i)$$

Expressat en funció dels components ortogonals

$$F_{ix} = \sum_{j=1}^n F_{ijx} \quad (j \neq i)$$

$$F_{iy} = \sum_{j=1}^n F_{ijy} \quad (j \neq i)$$

El procediment consisteix en els següents passos:

- Càlcul de totes les forces per a cada element
- Desplaçament dels elements proporcionalment a les forces i tornar al primer pas.

El procés es va repetint fins que els elements van formant grups prou compactes com per considerar-los finalitzats.

Cal destacar dues característiques del procediment:

- En el desplaçament de cada punt no es té en compte ni la velocitat ni l'acceleració adquirida en el desplaçament anterior. Això simplifica els càlculs i disminueix la formació de grans oscil·lacions entorn els nuclis estables.
- La magnitud dels desplaçaments associats a uns valors determinats de les forces pot afectar l'evolució del procés d'agregació. Els desplaçaments petits corresponen a una situació més pròxima a la d'uns elements materials dotats de massa real, permetent una gran modificació de l'estructura global durant l'agregació. El moviment dels punts es més suau i uniforme i les oscil·lacions entorn els nuclis són relativament petites.

Si els desplaçaments són grans, l'agregació es més coherent amb l'estructura inicial dels elements i no es veu tant subjecte a canvis, però té l'inconvenient que les oscil·lacions entorn els nuclis són massa grans.

Cal triar doncs els desplaçaments adoptant un compromís entre les dues solucions.

### 3.3.8.5.3.2. Agregació gravitatòria limitada

En el mètode anterior, quan dos punts són molt pròxims o coincidents els desplaçaments resultants són enormement grans o inclús infinits, amb el que l'estructura del grup es desestabilitza totalment.

Per tal d'evitar això s'ha fet que els desplaçaments siguin tots de la mateixa magnitud, variant únicament la direcció d'aquests en funció de l'orientació de la força resultant .

Aquesta operació equival a normalitzar els components obtinguts segons el procediment anterior i multiplicar-los per el valor del desplaçament triat. Així tenim:

$$D_{ix} = \frac{F_{ix}}{F_{ix}^2 + F_{iy}^2} D, \quad D_{iy} = \frac{F_{iy}}{F_{ix}^2 + F_{iy}^2} D$$

on,  $D_{ix}$  i  $D_{iy}$  són els components del desplaçament i,  $D$  és el desplaçament

Aquest procediment s'assembla al que tindria lloc si l'agregació d'un grup d'elements materials tingués lloc en un medi amb una gran viscositat tal que limités la velocitat a un valor determinat.

L'elecció del desplaçament  $D$  està subjecte a les mateixes consideracions que en el cas anterior.

A continuació es mostra l'algoritme utilitzat. Aquest algoritme també serveix pel mètode anterior si s'exclou l'etapa de normalització.

3.3.8.5.3.2.1. Algoritme per el mètode d'agregació amortida limitada .

Passos      Descripció

- 1      Entrar la matriu  $P(n * p)$  ' Conté les  $p$  ordenades dels  $n$  elements
- 2      Per  $i=1$  fins a  $n$ , repàs dels  $n$  elements  
       Càlcul de l'atracció del nivell sobre l'element  $i$   
       Per  $j=1$  fins a  $p$ ,  $D_{ij} = 0$  ' Posa a zero els components de l'atracció sobre  $i$ .  
       Tancar el cicle de  $j$ .  
       Per  $j=1$  fins a  $n$  'Càlcul de l'atracció de cada element sobre l' $i$ .  
       Si  $i=j$ , anar al pas 3 ' es tractarà del mateix element.  
        $W=0$  'és la distància al quadrat entre els elements  $j$  i  $i$ .  
       Per  $k=1$  fins a  $p$  ' són les  $p$  dimensions  
        $W=W+(P_{jk}-P_{ik})^2$   
       tancar el cicle de  $k$ .  
       Càlcul dels components de l'atracció entre els elements  $j$  i  $i$ .  
        $W=W * \text{SQR}(W)$  ' és el denominador de l'expressió  
       Per  $k=1$  fins a  $p$  ' són els  $p$  components  
        $D_{ik}=D_{ik}+(P_{jk}-P_{ik})/W$   
       acumula cada component.  
       Tancar el cicle de  $k$   
       Tancar el cicle de  $j$ .  
       Normalització de l'atracció del núvol sobre l'element  $i$ .  
        $W=0$  ' és l'atracció elevada al quadrat  
       Per  $j=1$  fins a  $p$  ' són les  $p$  dimensions  
        $W=W+D_{ij}^2$   
       Tancar el cicle de  $j$ .  
       Càlcul dels components corresponents a un desplaçament KC.

- $W = KC / \text{SQR}(W)$  ? càlcul del factor  
 Per  $j=1$  fins a  $p$   
 $D_{ij} = D_{ij} * W$   
 Tancar el cicle de  $j$ .  
 Tancar el cicle de  $i$ .
- 5 Situació dels elements després del desplaçament  
 Per  $i=1$  fins a  $n$  ? són els  $n$  elements  
 per  $j=1$  fins a  $p$  ? són les  $p$  coordenades  
 $F_{ij} = F_{ij} + D_{ij}$   
 tancar el cicle de  $j$ .  
 Tancar el cicle de  $i$ .
- 6 Tornar a 2.

#### 3.3.8.5.4. Funcions de classificació

En aquest mètode es tracta de trobar una colla de funcions que permetin predir a quin grup pertany un individu determinat.

Els càlculs necessaris permeten la seva formalització matemàtica i es poden considerar molt pròxims a l'anàlisi discriminant (241). El procediment és el següent:

Es defineix una matriu de variables,  $X$ , que conté els valors de les respostes a considerar (els harmònics). Aquesta matriu és doncs, la mateixa  $X$  que a l'anàlisi discriminant. Igualment, es defineix la matriu  $Y$  amb valors binaris que indiquen la pertinença als diferents grups. Els càlculs per a estimar  $B$  i  $Qe$  són idèntics a l'anàlisi discriminant, per tant es faràn servir les equacions del model linial. Els  $p$  vectors de la matriu  $B$ , són els valors mitjans de les  $m$  variables per cada un dels  $p$  grups.

La matriu  $S$  de funcions de classificació s'obté fent:

$$S = Qe^{-1} B$$

on,  $S$  és la matriu de classificació ( $m \times p$ )  
 $Q_e$  és la matriu d'errors quadràtics ( $m \times m$ )  
 $B$  és la matriu de paràmetres ( $m \times p$ )

Cada un dels vectors de  $S$  correspon a la funció de classificació del grup corresponent. Cada funció té un valor constant associat:

$$s_{0i} = -(1/2) \sum_{j=1}^m S_{ij} b_{ij}$$

Un cop conegudes les funcions de classificació (els vectors de  $S$  i  $s_0$ ) el procediment de classificació per a un element qualsevol consisteix en aplicar les funcions fent:

$$s_i = s_{0i} + \sum_{j=1}^m s_{ji} x_{kj} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, p \\ k = 1, 2, \dots, n \end{array}$$

El grup al qual s'assigna l'element és el corresponent a la funció que doni el valor de  $s$  més gran.

Si l'assignació de grups es correspon amb la realitat, es pot considerar que hi ha prou característiques, com per a diferenciar els elements d'un i altre grup.

### 3.3.9. PROVA DE WILCOXON

La prova dels parells igualats de Wilcoxon es un test no paramètric que s'utilitza per quantificar la direcció de les diferències entre parells de dades. Aquesta prova dona més importància al parell de dades que presenta una diferència gran entre les dues condicions que el parell que presenta una diferència petita.

S'ha utilitzat per trobar la significació dels resultats obtinguts de les funcions de classificació segons els sexes.

El procediment a seguir en aquest mètode és el següent:

- En primer lloc es determina la diferència del signe entre les puntuacions dels dos grups.
- S'ordenen les diferències sense tenir en compte el signe. Les diferències que són iguals obtenen com a puntuacions la mitjana dels rangs corresponents.
- S'afageix a cada rang el signe (+ o -) que li correspon.
- Es determina T, que és la suma més petita dels rangs igualtats i N que és el nombre total de diferències amb un signe determinat.

Si  $N < 25$ , es busca el valor de T per els diferents valors de N a les taules de Wilcoxon. Si es més petit o igual al valor tabulat per a un nivell de significació  $\alpha$ , es rebutja l'hipòtesi nula, el que vol dir que les diferències són significatives.

Si  $N > 25$ , es calcula el valor de z segons la fórmula:

## Material i mètodes

$$z = \frac{T - (N(N+1)/4)}{\sqrt{(N(N+1)(2N+1)/24)}}$$

I es determina la probabilitat associada segons una distribució normal.

#### 4. RESULTATS

##### 4.1. ESTUDI DEL PERIODE ENDOGEN, TAU

El període endogen,  $\tau$ , de cada animal s'ha calculat mitjançant el mètode del períodegrama, que ha estat descrit en l'apartat de material i mètodes.

S'ha assajat la significació dels períodes existents en l'interval circadiari entre 1400 i 1600 minuts estudiats cada 5 minuts. En total, s'han estudiat 40 possibles períodes per a cada animal, considerant-se com a període endògen el període que fos més significatiu, es a dir, que presentés una significació en la prova  $\chi^2$  quadrat superior a la dels demés.

En un primer assaig el períodegrama va ser realitzat utilitzant 15 dies de l'estat adult de l'animal. Posteriorment, es van utilitzar tots els dies de registre que es disposaven de cada animal. Els resultats han estat molt semblants en els dos cassos, els pics significatius del períodegrama ho són en tots dos cassos. La diferència estava en que utilitzant tots els dies de registre la significació dels pics és molt més elevada. Es per això que s'ha considerat aquest segon assaig com a més fiable i el tau de cada animal s'ha obtingut d'aquests períodegrames, que són els que es mostren en aquest apartat.

En les figures 10-42 es mostren els períodegrames de cada animal, així com el nivell mínim de significació segons els graus de llibertat.

Els valors dels taus obtinguts per a cada un dels animals es mostra a la taula 1

S'observa com els períodes dels animals estan entre 1475 i 1545 minuts, estant la majoria al voltant de 1510 minuts. La representació en forma d'histograma de la freqüència d'aparició de cada tau es mostra a la figura 43. La distribució obtinguda dels taus oscil·la al voltant d'una mitjana de 1514 minuts, mitjana de



tots els animals, amb una desviació estàndar de 19 minuts. S'ha estudiat l'ajust d'aquesta distribució a una normal 0,1 mitjançant una prova  $\chi^2$  quadrat, donant una probabilitat  $p < 0.005$ .

Posteriorment s'ha calculat el tau mitjà per famílies, i per sexes dins de cada família, no trobant-se diferències entre elles en quant a aquest paràmetre. Tampoc no s'han trobat diferències en quant al tau entre mascles i femelles. Els valors obtinguts dels taus mitjans es mostren a la taula 2.

## 4.2. EVOLUCIO DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA

### 4.2.1. FUNCIO D'ACTIVITAT MOTORA

#### 4.2.1.1. Cronograma

En primer lloc s'ha representat gràficament la funció d'activitat motora de cadascun dels animals a estudiar. S'ha graficat l'activitat motora de les rates per períodes de 24 hores, per a cada individu i per a cada un dels dies que va durar d'experiment. Les gràfiques individuals es mostren a les figures 44-61.

Al haver-se estudiat l'activitat motora en condicions de llum constant, el ritme segueix un període superior a les 24 hores, el que fa que l'observació de patrons característics de la forma de la funció sigui difícil. No obstant hi ha una sèrie de fets ben observables, encara que en alguns animals millor que en altres, que mostren algunes característiques de la evolució del ritme.

1) En primer lloc s'observa com en els primers dies de registre els animals presenten pics d'activitat distribuïts a tot el llarg del dia, mentre que cap al final del registre els animals mostren els pics

d'activitat més agrupats cap a una zona determinada del dia. Es a dir, cap al final del registre s'observen zones de més i de menys activitat. Lògicament aquests períodes d'activitat no es produeixen a la mateixa hora en els diferents dies degut a que el ritme segueix el seu curs lliure, i no de 24 hores.

2) En molts animals es pot veure com un cert patró de conducta motora es va repetint amb els dies. S'observa com hi ha uns determinats pics d'activitat que es van desplaçant com es en el cas de la rata #3 del dia 22 en endavant.

3) Un altre fet que s'observa es com hi ha alguns animals, també dins de la mateixa família, que presenten amb més freqüència períodes d'activitat que altres, com pot ser el cas de l'animal #5 de la primera família.

Aquestes tres característiques, comentades per animals de la família "1" poden observar-se també en les demés famílies. En la família "2", no es té registre dels primers dies de l'aïllament pel que no es pot observar la primera característica, igualment, i amb més motiu, que en la família "6". En aquestes dues famílies si que s'observa clarament el fenomen 2 de repeticions de patrons de conducta com es el cas dels animals #8, #9 i #10 de la família "2" i dels #31, #32, #33 a partir del dia 34. En els animals de les famílies "3", "4" i "5" s'observen bé les dues característiques, sobre tot la 2 en els animals #17 a partir del dia 30, en el #27 a partir del dia 10 i en el #27 i #28 a partir del dia 32.

La repetició, dia a dia del patró d'activitat té lloc sobre tot quan l'animal es ja adult, es a dir cap als darrers dies de registre on ja es presenta un ritme estable tant en quan al període com al patró.

#### 4.2.1.2. Doble grafica

Una de les representacions grafiques més utilitzades

per a visualitzar un ritme i el moment de la seva aparició es la representació en doble gràfica, o "double plotted". En aquest tipus de gràfica es representa en cada línia horitzontal 48 hores de registre. En abscises, en cada unitat de temps, és dibuixa una ratlla vertical, per cada 100 unitats arbitràries de moviment. D'aquesta manera les zones fosques de la gràfica corresponen a fases d'activitat de l'animal. S'anomena en doble gràfica per que l'activitat de cada dia es representa dues vegades, una a l'inici de línia i l'altre en la segona meitat de la línia superior. Així doncs, si es comença la gràfica per el dia 1 de registre, la primera línia estarà formada per els dies 1 i 2, la segona per els dies 2 i 3 i així succesivament.

En les figures 62-80 es mostren les dobles gràfiques d'activitat de cadascun dels 33 animals. Com a trets generals per tots ells, s'observa com a l'inici del registre, els moviments es presenten repartits tot al llarg del dia, la qual cosa indica una manca de ritmicitat en l'activitat. Més tard, entre els dies 20-25 després del desalletament, els moviments s'agrupen en uns períodes concrets del dia, desplaçant-se la zona d'activitat en els dies següents segons el període tau. La inclinació de les columnes d'activitat cap a la dreta, reflexa com els animals segueixen un ritme de període superior a les 24 hores.

#### 4.2.2. ESPECTRES DE POTENCIA

Amb les dades d'activitat motora s'ha realitzat una anàlisi espectral en base al tau propi de cada rata, per cada un dels dies que ha durat el registre.

Per a visualitzar els espectres de potències s'ha recorregut a dos tipus de representacions gràfiques. L'una és mitjançant un histograma del contingut de potència de cada un dels 20 harmonics. L'altre es mitjançant una matriu gràfica d'espectres.

#### 4.2.2.1. Histogrames d'espectres de potències

##### 4.2.2.1.1. Histogrames individuals

En les figures 81-98 es mostren els histogrames dels espectres de potència de cada animal i per a cada dia de registre.

S'observa com la forma de l'espectre es força variable tant entre els diferents animals com dia a dia en un mateix animal. No obstant això, com a característiques generals s'observa com en els primers dies de registre hi ha un predomini dels harmònics ultradiaris. A partir d'un moment determinat, mes o menys ben definit per a cada animal, es l'harmònic 1 (harmònic circadiari), el que passa a ser predominant. Aquest harmònic es el que prevaleix fins als darrers dies de registre.

##### 3.2.2.1.2. Histogrames mitjanes segons sexes i famílies

En les figures 99-116 es mostren els espectres de potència per famílies, agrupats segons sexes.

En la família "1" s'observa com les femelles adquireixen abans que els mascles l'harmònic 1 com a harmònic principal. En les femelles, l'harmònic 1 té un contingut de potència superior als altres harmònics a partir del dia 8 mentre que en els mascles no es fins al dia 15.

En la família "2" s'observa com al principi de l'aïllament els harmònics 7 i 8 presenten un elevat contingut de potència. L'harmònic circadiari és el predominant a partir del dia 20 en els dos sexes. Sobre els dies 37-43 s'observa com els mascles presenten components ultradiaris importants, sobre tot els harmònics compressos entre l'harmònic 4 i el 9.

En la família "3", en els primers dies de registre s'observa un predomini dels harmònics ultradiaris, sobre tot dels harmònics 7 i 8. Tant en els mascles com en les femelles, l'harmònic 1 no es clarament superior

als demés fins al dia 22, si be, en dies anteriors les femelles presenten un CPH1 lleugerament superior al dels mascles. Aquesta família s'ha registrat durant un període de temps més llarg que les demés, observant-se com als darrers dies de registre, sobre tot entre els dies 55-70 els mascles presenten un CPH1 superior al de les femelles.

La família "4.1", formada per tres femelles, presenta al principi del registre, un contingut de potència elevat en els harmònics compresos entre el 6 i el 9. L'harmònic 1 no es el principal fins al dia 25, on es presenta juntament amb altres components harmònics ben definits.

En la família "4.2" s'observa com en els primers dies els components ultradiaris son més predominants en els mascles que en les femelles. En les femelles l'harmònic circadiari comença a ser manifest cap al dia 18, encara que no és el predominant fins al dia 22. En els mascles, l'harmònic 1 apareix cap al dia 21. En aquesta família els mascles sempre presenten més components ultradiaris que les femelles. Cal tenir present que en aquesta família el registre només ha durat fins al dia 28.

En la família "5" els mascles presenten més contingut de potència en els harmònics ultradiaris que les femelles, sobre tot, són importants al principi de l'aïllament els harmònics 7 i 8. Tant en mascles com femelles, l'harmònic 1 es el principal a partir del dia 19.

En la família "6", registrada a partir del dia 29, s'observa la prevalença de l'harmònic 1 sobre els altres. A partir del dia 33 els mascles presenten un CPH1 superior al de les femelles.

#### 4.2.2.1.3. Histogrames mitjans segons famílies

En les figures 117-119 es mostren les mitjanes de tots els animals agrupats per famílies per cada un dels dies

de registre. La mitjana de la família "4" comprén els animals de les famílies "4.1" i "4.2".

S'observa com al principi tots els animals presenten un patró ultradiari. El dia d'aparició de l'armònic 1 com a harmònic principal es diferent per a cada família. Així, en la família "1" l'armònic circadiari es el principal a partir del dia 10, en la "2" a partir del 14, en la "3" del 19, en la "4" del 20 i en la "5" del 23 tot i que en aquesta família manquen dies anteriors.

En la família "3", de manera molt visible, s'observa com en el principi del registre hi ha un patró ultradiari característic que es va repetint en els diferents dies. Aquest patró representa un contingut de potència elevat dels harmònics compressos entre el 7 i el 10.

#### 4.2.2.1.4. Histogrames mitjans segons els sexes

En les figures 120-122 es mostren les mitjanes diàries dels espectres, segons el sexe dels animals, permetent un estudi comparatiu sobre les evolucions de l'espectre en cada cas.

S'observa com tots els animals en un principi presenten un predomini dels harmònics ultradiaris. En els dos sexes, l'armònic 1 va augmentant en contingut de potència amb el temps, arribant a ser el més important a partir del dia 19.

En general els mascles presenten tots els dies un contingut de potència dels harmònics ultradiaris més elevat que les femelles. S'observa també com la zona de predomini ultradiari de les femelles es troba cap a la meitat de l'espectre entre els harmònics 5 i 12, mentre que en els mascles hi ha un cert contingut de potència en harmònics de diferents freqüències, fins i tot de freqüències molt baixes com són els harmònics 17 i 18.

#### 4.2.2.1.5. Histogrames mitjans totals

En les figures 123-125, es mostren les mitjanes diàries dels espectres de potències per a tots els animals. D'aquí es poden extreure les característiques principals de l'evolució del patró del ritme d'activitat.

S'observa com en els primers dies després del desalletament hi ha un predomini de components ultradiaris sobre tot dels harmònics compressos entre el 7 i el 11. En els dies següents, cap al dia 4-5, s'observa com un desplaçament dels harmònics predominants que passen a ser els harmònics entre el 5 i el 8. Entre els dies 11-14, tot i que els harmònics més importants segueixen estant els ultradiaris, s'observa com no hi ha cap harmònic que sobresurti de manera evident per sobre dels altres, observant-se una uniformitat en l'espectre. A continuació ja apareix com a més important l'harmònic 1. L'harmònic circadiari, si bé presenta un cert contingut de potència tots els dies de registre, va augmentant de manera evident cap als dies 8-10, essent l'harmònic principal a partir del dia 23. Per últim, quan l'animal ja es adult i manifesta clarament el ritme circadiari als darrers dies de registre, segueixen havent-hi un cert nombre de components ultradiaris que corresponen a la zona entre el 5 i el 8.

En calcular les mitjanes dels animals, degut a que en la majoria dels dies no es tenia el registre de tots els animals, es varen utilitzar només aquells dies en que com a mínim es disposés del registre de la meitat dels animals dels que es faria la mitjana. Si s'utilitzessin dies amb menys nombre d'animals podria donar errors en l'interpretació degut a variacions individuals. Per exemple, en fer la mitjana de les 17 femelles, s'han utilitzat només els dies en que com a mínim es disposés del registre de 9 femelles.

#### 4.2.2.2. Matriu gràfica d'espectres

Una segona manera de visualitzar els espectres de potència es mitjançant una matriu gràfica (58). Per

aquest mètode es representa una matriu que tingui tantes files com dies de registre i tantes columnes com harmònics a representar. Així la matriu està formada per una sèrie de quadrats on cadascun correspon a un harmònic determinat per a un dia concret. En cada quadrat es representa una ratlla segons un contingut de potència desteterminat. En el nostre cas, cada ratlla representa un 2% del contingut de potència total de la funció per cada dia. En conseqüència, observant la figura en el seu conjunt, s'observa que els harmònics més importants, amb contingut de potència més elevat, presenten una densitat de ratlles superior als demés. Aquest mètode permet una bona observació de l'evolució dels espectres.

#### 4.2.2.2.1. Matrius d'espectres individuals

En les figures 126-155, es mostren les matrius gràfiques dels 33 animals per tots els dies del seu registre. Es pot comprovar com existeix una gran variabilitat en quant als components ultradiaris, fins i tot per als diferents dies d'un mateix animal. No obstant, en tots els animals s'observa com al principi de l'aïllament, la densitat, de ratlles més elevada es troba en els harmònics ultradiaris, fins al dia en que el contingut de potència de l'harmònic circadiari va augmentant i arriba a ser predominant.

#### 4.2.2.2.2. Matrius mitjanes segons sexes i famílies

En les figures 156, 158, 160, 161, 163, 164 i 167, es mostren les matrius mitjanes segons sexes dels animals de les 6 famílies. S'observa com en totes les famílies l'harmònic circadiari apareix primer com a predominant en les femelles que en els mascles. Al principi de l'aïllament els harmònics ultradiaris estan més ben definits en els mascles que en les femelles. En la família "3", de la que es disposa d'un registre més llarg, s'observa com al final del registre son els mascles els que tenen l'harmònic circadiari més ben definit. En els animals de la família "6" el contingut de potència més gran correspon als mascles.



#### 4.2.2.2.3. matrius mitjanes segons famílies

En les figures 157, 159, 162, 165, 166, 168 i 169, es mostren les matrius d'espectres mitjanes per a cada una de les famílies.

En la família "1" s'observa com hi ha una zona ultradiària corresponent als harmònics 7, 8 i 9 amb elevat contingut de potència els primers dies de l'aïllament. Els harmònics 8 i 9 disminueixen aviat de contingut de potència i queda l'harmònic 7. Aquest harmònic serà el que perdurarà com a ultradiari fins al final del registre. L'harmònic 1 apareix sobre el dia 8 i va incrementant en contingut de potència.

En la família "2" els harmònics predominants al començament de l'aïllament són els de la zona entre el 7 i el 10. S'observa com aviat la prevalença en el camp ultradiari passa a ser dels harmònics 5 i 6. L'harmònic 1 és el principal a partir del dia 20.

En la família "3" gairebé durant tot el registre tenen importància en el domini ultradiari els harmònics 6, 7 i 8. L'harmònic 1 es el principal a partir del dia 23.

La família "4.1" presenta en un principi un contingut de potència elevat en els harmònics 7 i 8 sent al final els més importants els harmònics 5, 6 i 7. L'harmònic circadiari es mostra com a més important a partir del dia 26.

En la família "4.2" són els harmònics 5, 6, 7 i 8 els components ultradiaris, tot i que al final del registre es mantenen el 7 i el 8. L'harmònic 1 es important a partir del dia 18.

En la família "5" són els harmònics 8 i 9 els que tenen un contingut de potència superior al principi de l'aïllament. Sobre el dia 9 l'harmònic 8 disminueix en contingut de potència i augmenta l'harmònic 6. L'harmònic circadiari té un alt contingut de potència

a partir del dia 22.

En la família 6 degut a que el registre va començar el dia 29 sempre s'observa l'harmònic circadiari com a més important. En el camp dels ultradiaris té importància l'harmònic 5 i també el 2 i el 3 tot i que aquests dos darrers poden ser conseqüència d'un cicle circadiari.

#### 4.2.2.2.4. Matrius mitjanes segons sexes

En les figures 170-171 es mostren les matrius mitjanes dels animals segons els dos sexes.

Aquestes matrius, així com la matriu mitjana total s'han calculat fins al dia 45, ja que fins a aquest dia es disposava gairebé dels registres de totes les famílies mentre que en dies posteriors, al haver menys animals, hagués donat una mitjana errònia.

S'observa com les femelles mostren, als primers dies de l'aïllament, els harmònics 7 i 8 com a principals. Entre els dies 4-9 no hi ha cap harmònic que sobresurti d'entre els altres. Aquests dies l'harmònic 1 ja és present encara que amb un contingut de potència baix. Cap al final del registre, quan ja es dominant l'harmònic 1, són els harmònics 6 i 8 els que representen el domini ultradiari.

La matriu dels mascles mostra com la zona de predomini ultradiari dels primers dies de l'aïllament corresponen als harmònics 7, 8 i 9 i que es desplaça aviat cap als harmònics 5, 6 i 7. Entre els dies 10-13 no hi ha cap harmònic predominant. L'harmònic 1 té un cert valor en quan a contingut de potència des del principi tot i que aquest valor és clarament superior al de la resta dels harmònics a partir del dia 13.

Les diferències en quan a l'evolució dels espectres entre els dos sexes es deuen a que les femelles adquireixen més aviat que els mascles la prevalença de l'harmònic 1 com a principal. Cap al final del registre el CPH1 del mascles és superior, ja que s'observa més densitat de ratlles. Per últim, els mascles mantenen els harmònics ultradiaris predominants durant tot el registre, mentre que en les femelles no són tant clars quins són els harmònics predominants.

#### 4.2.2.2.5. Matriu mitjana total

En la figura 172 es mostra la matriu gràfica

d'espectres mitjana de tots els animals.

S'observa com en els primers dies després del deslletament hi ha un predomini dels harmònics ultradiaris compressos entre el 6 i el 10, sobre tot dels harmònics 7 i 8. Es a dir en aquest període de vida predominen els ritmes entre 4 i 2.4 hores. Cap al dia 10 els harmònics principals son els harmònics 5 i 6. Entre els dies 9 i 11 no hi ha cap harmònic que sobresurti de manera evident sobre els altres observant-se una homogeneïtat dels continguts de potència del diferents harmònics.

L'harmònic 1, si be ja es present tots els dies de vida de l'animals, comença a ser important sobre el dia 10 i va incrementant el contingut de potència. Cap al dia 20 i fins al final del registre és ja el principal component de l'espectre.

Al final del registre, quan els animals ja tenen ben definit l'harmònic 1 com a harmònic principal, els harmònics ultradiaris que es segueixen mantenint son els situats en la zona entre el 5 i el 9.

#### 4.2.2.3. Patró de l'espectre de potències

El patró de l'espectre de potències de la rata passa de ser ultradiari en els primers dies després del deslletament a ser circadiari en l'estat adult. Tal com s'ha vist, a partir d'un dia determinat es manté ja el harmònic circadiari més una serie de components ultradiaris característics que defineixen el patró típic de l'animal adult. Aquest patró es ja el patró característic de cada animal.

S'ha calculat quin es l'espectre mitjà d'adult de cada un dels 33 animals. Aquest càlcul s'ha realitzat fent la mitjana dels espectres dels dies en que l'animal es adult. Hem considerat que l'animal mantenia el ritme circadiari estable a partir del dia 24 després del deslletament. Segons aixó la mitjana de cada animal s'ha calculat amb els dies que es disposessin a partir

del dia 24.

En les figures 173-179 es mostren els espectres mitjans de cada un dels animals.

En la figura 180 es mostren els espectres mitjans per a cada família. S'observa com els valors dels continguts de potència de cada harmònic, sobre tot del circadiari, són diferents segons cada família. Així, la família "3" és la que presenta un valor màxim de CPH1 i la família "1" la d'un valor de CPH1 més baix.

Per tal de definir el nivell mínim de significació de la potència dels harmònics del nivell d'error o soroll, es fà, gràficament, una línia pel nivell dels valors de la potència dels 8 darrers harmònics, que són els que contenen majoritàriament soroll. Extrapolant aquesta línia fins al primer harmònic, s'obté una separació entre el que es soroll i el nivell de potència veritablement significatiu dels harmònics. Així, s'observa com són els harmònics 5 i 6 els més significatius dins el camp dels ultradiaris. En algunes famílies també sobresurten els harmònics 8 i 9.

En la figura 181 es mostra el patró típic mitjà de la rata adulta així com el patró característic per cada sexe.

S'observa que l'espectre de la rata adulta està format bàsicament per un harmònic circadiari amb un 18% de contingut de potència i pels ultradiaris 5 i 6.

Els espectres de les femelles i dels mascles són molt semblants. Les femelles presenten un CPH1 lleugerament superior als mascles sense ser aquesta diferència significativa. En els dos sexes predominen com a harmònics ultradiaris el 5 i el 6. En els mascles també sobresurt lleugerament l'harmònic 9 i en les femelles el 7. L'aplicació d'un test Xi quadrat per a trobar diferències en quant al patró dels dos sexes no va donar diferència significativa ( $p > 0.5$ ).

#### 4.2.3. EVOLUCIO DE DIFERENTS PARAMETRES DEL RITME D'ACTIVITAT

En els resultats obtinguts fins ara es mostra com els animals passen de ser ultradiaris a ser circadiaris. A continuació s'ha estudiat quina es l'evolució respecte al temps de diferents paràmetres característics del ritme circadiari d'activitat. Els paràmetres estudiats han estat el valor mitjà d'activitat motora diari, o MESOR, calculat segons el tau propi de cada animal i que pràcticament equival a la mitjana del ritme, el CPH1 com a indicador del caracter circadiari de la funció i el CPH8.

Es va triar l'harmònic 8 pels següents motius. En els primers dies de l'aïllament hi ha un predomini dels harmònics ultradiaris, especialment dels harmònics compressos entre el 6 i el 9. Es van analitzar les evolucions d'aquests harmònics i de tots ells l'harmònic 8 era el més característic en quan a la seva importància i evolució en el temps. Es per aixó que s'ha estudiat la evolució de l'harmònic 8 per considerar-lo representatiu dels harmònics del domini ultradiari.

L'evolució dels tres paràmetres, AMT, CPH1 i CPH8 s'ha estudiat per a cada animal de manera individual, per mitjanes familiars, per sexes i per a la mitjana total. Al igual que en altres gràfics mitjans, les mitjanes han estat fetes utilitzant els dies en que com a mínim hi hagués registre de la meitat dels animals dels que es calcularia la mitjana. Per assegurar-nos-en de que amb aquest criteri no es trobarien errors deguts a variacions individuals, es va fer un estudi previ de l'interval en que estaven compressos els valors dels paràmetres, comprovant que cap animal tenia valors allunyats de la mitjana del conjunt. Aixó es va fer per que si per exemple, algun animal tingués un valor molt diferent en l'evolució d'un paràmetre a la resta dels animals seria molt significativa la diferència entre els dies en que aquest animal intervingués en la

mitjana o no. Al no trobar-se cap animal massa diferent dels altres, l'evolució mitjana dels paràmetres pot calcular-se sense errors importants al utilitzar alguns animals diferents en els diferents dies.

#### 4.2.3.1. Evolució de l'activitat motora, AMT

En les figures 182-188 es mostren els gràfics de l'evolució de l'activitat motora en el temps.

En la figura 221 es mostren les mitjanes d'activitat de tots els animals i també dels mascles i femelles per separat.

S'observa com els valors d'activitat es mantenen força constants durant tots els dies. En els primers dies de l'aïllament s'observa com un petit augment que és compensat en valors absoluts en la resta de la gràfica.

Per trobar la tendència de la corba d'activitat s'han assajat diferents regressions sense que cap fos gaire satisfactòria. S'han assajat la funció logaritmica, l'exponencial i la normal invertida. En tots els cassos el millor ajust s'acostava a una funció linial i gairebé de valor constant. Es degut al poc ajust trobat, que no s'hagi inclòs la funció de regressió a la gràfica.

#### 4.2.3.2. Evolució del CPH1

En les figures 189-195 es mostren les gràfiques individuals d'evolució del CPH1. S'observa que la tendència de la funció es asimptòtica tot i que es presenten moltes variacions individuals en els diferents dies.

En la figura 222 es mostren les mitjanes de l'evolució del CPH1 per sexes i en una mitjana total, així com l'ajust de les corbes a la funció asimptòtica, expressament definida.

La corba d'evolució del CPH1 de la mitjana de tots els animals s'ajusta a la funció amb un coeficient de regressió de  $r = 0.797$ . El valor de la asymptota es del 17 % i el dia de la inflexió de la corba es el dia 19.94.

Aquests resultats coincideixen, en quant al moment d'aparició de l'harmònic circadiari com a harmònic principal de la funció, amb l'estudi de les matrius gràfiques d'espectres i amb la doble gràfica.

Comparant la mitjana de les femelles amb la dels mascles s'observen algunes diferències.

En la corba mitjana de les femelles, s'observa com la inflexió de la corba es produeix al dia 21 i arriben a una asymptota del 16% de la potència total. El 75 % del valor asimptòtic es produeix en el dia 21. L'ajust a la funció ha donat un coeficient de correlació d' $r = 0.723$ .

Tot i que en els mascles el contingut de potència del harmònic 1 sigui inferior al de les femelles a l'inici del període de registre, en els mascles l'asimptota arriba a un valor del 30 %, estant el punt d'inflexió en el dia 30 i arribant al 75% del valor de la asymptota en el dia 55. L'ajust a la funció es de  $r = 0.827$ .

Així doncs, les diferències entre mascles i femelles en quant a l'evolució del CPH1 són :

- 1) Les femelles presenten als primers dies uns valors de CPHC superiors als dels mascles.
- 2) En les femelles el CPH1 inicial es manté de manera força constant fins al dia 21 en que hi ha un increment fort, arribant-se gairebé al 75% de la asymptota.
- 3) En els mascles, el valor del CPH1 al principi de la gràfica es inferior i va incrementant de manera continua i suau durant tots els dies en que dura el



registre assolint el valor asimptòtic més tard que les femelles.

#### 4.2.3.3. Evolució del CPH8

S'ha triat l'harmònic 8 com a més característic dels harmònics ultradiaris presents a l'inici de l'aïllament.

En les figures 196-202 es mostren els gràfics d'evolució del CPH8 per a cada animal. En la figura 223 es mostra l'evolució del CPH8 per a la mitjana de tots els animals, per mascles i femelles.

S'observa com l'evolució del CPH8 amb el temps segueix una funció inversa a la del CPH1, presentant valors més elevats al principi i disminuint posteriorment.

En la mitjana de tots els animals, l'harmònic 8 parteix d'un valor de 10.3 % que va decreixent fins a un valor de 2.37 en els darrers dies de l'aïllament, produint-se una inflexió de la corba cap el dia 16.

En les femelles, l'ordinada en l'origen es de 8.59 %. Aquesta corba pateix una inflexió en el dia 1.77, arribant com a valor mínim asimptòtic a 2.94 %.

En els mascles, El valor inicial es superior al de les femelles, partint de 11.28 % i arribant a un valor mínim de 3.36, amb una inflexió en el dia 9.31.

Les diferències entre els dos sexes radiquen, doncs, en que en els primers dies de l'aïllament les femelles tenen valors superiors als mascles en quant al CPH1 mentre que inferiors en quan al CPH8. Els mascles tarden més en adquirir l'harmònic circadiari com a harmònic principal, mostrant més contingut de components ultradiaris.

En les taules 36 i 37 es mostren els valors dels paràmetres obtinguts per la funció de correlació del

CPH1 i el CPH8.

#### 4.2.3.4. Mitjanes d'evolució per famílies

En les figures 203-220 es mostren les mitjanes d'evolució dels valors de AMT, CPH1 i CPH8 per a cada família amb les funcions d'ajust corresponents al CPH1 i CPH8. Tal com s'ha comentat anteriorment, en el cas de l'activitat motora no s'ha representat la funció d'ajust, ja que cap d'elles s'ajustava bé a la corba, exceptuant la normal invertida, que només es útil a nivell individual i està comentada en l'apartat 3.3.3.4.

S'observa que cada família presenta uns valors d'asíptota i punt d'inflexió determinats per a cada corba.

Per la mitjana de la família "6" també s'ha calculat la funció d'ajust tot i essent conscients dels pocs dies que en disposàvem.

S'observa com l'asíptota més alta, en quant al CPH1 correspon a la família "3". Aquesta família es la que presenta també uns valors de CPH8 més elevats. La família "1" es la que presenta un punt d'inflexió de la corba del CPH1 anterior a la de les demés famílies.

#### 4.2.4. RELACIÓ ENTRE AMT I CPHC DURANT EL DESENVOLUPAMENT DE L'ESPECTRE

De l'estudi de l'evolució del ritme d'activitat surgeix la qüestió de quina es la relació, si n'hi ha, entre la quantitat d'activitat motora diària i el moment d'aparició de l'harmònic circadiari.

En les gràfiques d'activitat motora representades en doble gràfica, s'observa com hi ha tres períodes ben manifestats, més evidents en alguns animals que en

altres. El primer correspon a una fase aritmica al començament de l'aïllament. El segon es una fase , sobre els dies 10-13, en que hi ha un decrement notable d'activitat motora i seguidament apareix el tercer periode en el que es recupera l'activitat motora i apareix ja el ritme de manera manifesta.

Aquest fet notable només d'una manera visual, es va convertir en una hipòtesi de treball per tal de comprovar si realment just abans de l'aparició del ritme circadiari d'activitat es produïa un descens en els valors diaris d'activitat. Per comprovar aquesta hipòtesi s'han ideat tres proves diferents, una visual i dues d'estadístiques que es descriuen a continuació.

Aquestes proves només s'han pogut realitzar amb aquells animals dels que es disposava d'un registre gairebé continu des dels primers dies de l'aïllament fins que l'animal tingués ja el ritme circadiari ben definit. Així s'ha pogut realitzar en un total de 17 animals corresponents als #1,#2,#3,#4,#5 de la família "1", #7,#8,#9,#10 de la família "2", #11,#12,#13,#14,#15 de la família "3", i #16,#17 i #18 de la família "4.1".

#### 4.2.4.1. Prova 1: Dobles gràfiques d'activitat motora suavitzades

Aquesta prova va consistir en fer un tipus de gràfiques especials que permetessin visualitzar millor el fenomen descrit anteriorment.

El mètode de càlcul ha estat el següent. S'han pres els 35 primers dies de registre de cada animal, calculant per aquests la mitjana total d'activitat motora per unitat de temps. A continuació s'ha representat una matriu gràfica, en doble gràfica, on cada vegada que l'activitat motora real de l'animal per unitat de temps supera la mitjana dels 35 dies es representa un quadrat negre. Si la dada es inferior a la mitjana es deixa en blanc. Amb això s'aconsegueix un "enduriment" del contrast entre les fases de moviment i de repós.

En una segona fase, per tal d'observar bé les periodicitats pròpies de cada animal i eliminar al màxim les possibles dades erràtiques, s'ha fet un suavitzat d'aquesta matriu mitjançant una mitjana mòbil. Es van assajar mitjanes mòbils amb diferent nombre de punts i es va trobar que el suavitzat amb 21 punts (10.5 hores) era el que millor permetia visualitzar aquest fenomen.

Les gràfiques d'activitat motora suavitzades amb 21 punts (10.5 hores), per a cada un dels animals es mostren a les figures 224-234. S'han representat també els gràfics per els animals de la família "4.2" i de la família "5" tot i que com s'observa manquen molts dies entremig i no permeten l'observació de la hipòtesi, es per aixó que ja no es tenen en compte en assajos posteriors sobre aquesta hipòtesi.

En tots els demés animals, s'observa com hi ha tres zones característiques tal com s'havia exposat:

1) Una primera zona mostra una quantitat d'activitat motora superior a la mitjana de l' experiment i amb els moviments repartits uniformement tot el llarg del dia.

2) En la segona fase s'observa com l'activitat motora està per sota dels nivells mitjans d'activitat, observant-se dies en blanc en la gràfica.

3) La tercera fase mostra com una altre vegada l'activitat està per sobre dels nivells mitjans de l'animal. S'observa com en aquest període el ritme circadiari està ja ben definit. Les fases d'activitat queden representades en columnes amb un desplaçament cap a la dreta indicant un període superior a les 24 hores.

En alguns dels animals, com el #3, #9 i #10, el ritme es manifesta ja des del principi del registre pel que no es pot observar la zona de descens d'activitat.

La durada de cada una de les tres fases es diferent per a cada animal així com el dia en que es manifesten. S'observa com en la família "1", el #1 té la fase de descens d'activitat motora entre els dies 12-20, el #2 entre els dies 10 i 13, el #3 entre els dies 4-10, en el #4 entre els dies 8-11, tot i que en aquest animal es presenten períodes d'activitat dins d'aquesta fase, i el #5 entre els dies 11-15. En tots els animals d'aquesta família hi ha un decrement d'activitat en els dies 29 i 30, que pel fet de donar-se en tots exactament al mateix temps fa pensar en alguna possible influència externa.

En els animals de la família "2" s'observa com la fase de baixa activitat es troba entre els dies 8-16. En tots els animals d'aquesta família manquen els cinc primers dies de registre, pel que no es pot observar la fase d'activitat inicial. Els #9 i #10 ja presenten d'entrada un ritme manifest.

En la família "3", el #11 presenta la fase de descens d'activitat entre els dies 16-24. En aquest animal l'activitat no és tant elevada quan apareix el ritme com en el període inicial. En el #13 no s'observa cap fase de disminució d'activitat motora. En el #14 la fase de disminució d'activitat es troba entre els dies 17-24 i en el #15 es presenta una zona molt ampla, entre els dies 13-23. Alguns dies dins d'aquesta zona presenten fases d'activitat que ja segueixen el període tau.

En els animals de la família "4.1", el #16 presenta una activitat motora elevada al principi que disminueix entre els dies 16-20, però no torna a ser tant elevada com els primers dies. El #17 no s'observa la fase de disminució d'activitat, al igual que en el #18 que presenta molt poca activitat al principi de l'aïllament.

En conjunt, es pot veure mitjançant les gràfiques suavitzades com els animals al principi de l'aïllament presenten uns dies en que no es segueix un patró circadiari i en els que l'activitat motora és superior

a la mitjana de l'animal. A continuació hi ha una fase en la que disminueix l'activitat motora. Aquesta fase té una durada i moment d'aparició diferent per a cada individu. Per últim hi ha una tercera fase en que l'activitat motora torna a ser superior a la mitjana i en la que es segueix el ritme propi de l'animal adult.

#### 4.2.4.2. Prova 2: Estadístic A

Un intent de quantificar de manera estadística el fenomen descrit anteriorment, va ser mitjançant la definició d'un estadístic apropiat i el càlcul de la seva funció de distribució. El càlcul d'aquest estadístic, que s'ha anomenat "A" i es descriu a l'apartat 3.3.4, permet trobar la significació estadística de la presència d'aquesta conducta.

El valor dels estadístics calculats per a cada animal es mostren a la taula 38.

Segons l'estadístic, no son significatives les series de valors obtingudes pels animals 1,2,5,8. Per tant de 17 animals a que s'ha aplicat el test 13 son significatius.

A continuació s'ha calculat la probabilitat d'obtenir 13 positius sobre una població de 17 individus segons una distribució binomial en la que la probabilitat de presència del succés es de 0.05 ( que es el nivell de significació d'A fixat per a que l'individu es consideri positiu) i per un risc inferior a 0.05. El resultat indica que aquesta probabilitat es:

$$1 - p(x \geq 14) \text{ per } n=17 \text{ i } p=0.05$$

$$p = 0.0000003$$

Es a dir, el fet d'obtenir 13 animals que compleixen aquest criteri sobre 17 es altament significatiu.

#### 4.2.4.3. Prova 3: Funció d'ajust de la corba d'activitat motora i relació amb el CPHC

La tercera prova assajada per tal de trobar si l'activitat motora disminueix en el moment de l'aparició de l'harmònic circadiari, consisteix en l'ajust de la corba d'evolució de l'activitat motora a una funció teòrica que compleixi les característiques de la hipòtesi a demostrar (veure 3.3.3.4). Posteriorment es comparen els valors d'aquesta corba amb els valors de la corba d'ajust del CPHC.

Aquesta prova s'ha realitzat amb els mateixos animals i dies pels que s'ha calculat l'estadístic A. Es a dir s'ha aplicat el test als 5 animals de la família "1" per 28 dies i als de les famílies "2", menys el #6, "3" i "4.1" per 45 dies, fent un total de 10 femelles i 7 mascles.

Paral·lelament, per cada un d'aquests animals s'ha fet l'ajust de l'evolució del CPHC en el temps segons la corba sigmoide. En la taula 39 es mostren els paràmetres obtinguts de l'ajust a aquesta funció a cada animal, l'ordinada en l'origen i el coeficient de correlació.

En les figures 236-242 es mostren els gràfics de les evolucions de l'activitat motora i del CPHC i les seves funcions d'ajust per a cada un dels 17 animals que s'han utilitzat a l'estudi.

S'observa com la disminució d'activitat motora es presenta en un període de la vida de l'animal, diferent per a cada un d'ells. Igualment, el pendent de la corba és més o menys accentuat segons l'individu.

L'ajust a les corbes d'activitat mostra com l'hipòtesi es compleix ja que la funció d'ajust amb les característiques comentades anteriorment segueix bé la funció d'activitat.

Tot i que les inflexions de les corbes es produeixen en diferents dies segons l'animal, de manera orientativa, s'ha representat una corba mitjana per a tots els individus, així com una corba mitjana per cada un dels dos sexes.

En la figura 243 es mostren els gràfics mitjans i en les taules 39-40 els valors dels paràmetres obtinguts.

S'observa que en cada gràfica mitjana es produeix una inflexió, o un mínim. En la mitjana total, aquest mínim és sobre el dia 17 per la corba d'activitat i sobre el dia 20 en la corba de CPHC. Les femelles presenten el punt d'inflexió i el mínim de les dues corbes molt propers el mínim de la corba d'activitat cap al dia 16 i la inflexió de la corba del CPHC al dia 17. Els mascles en canvi mostren més diferències entre els dos punts, estant el mínim de la corba d'activitat cap al dia 17 i la inflexió de la corba del CPHC en el dia 33. Aquestes correlacions s'ajusten al fet, trobat anteriorment de que els mascles adquireixen un valor asimptòtic de CPHC més tard que les femelles.

Tenint en compte que els punts d'inflexió i mínim de les corbes son paràmetres més aviat individuals que col·lectius i observant les diferències existents entre els dos sexes en gràfiques mitjanes, s'ha fet la següent suposició. Pot haver-hi una relació entre els sexes dels animals i el fet de presentar el mínim de la corba d'activitat abans, o després, de l'inflexió en la corba del CPHC. Per tal d'estudiar aquesta hipòtesi, s'ha representat gràficament els individus que presenten el punt d'inflexió de la corba del CPHC abans que el punt de la corba d'activitat i els que el presenten després. El gràfic obtingut es mostra en la figura 243.

En aquesta figura s'observa com hi ha 6 femelles que presenten el punt d'inflexió de la corba de CPHC abans que el dia del mínim de l'activitat i 4 femelles que el presenten després. Tots els mascles presenten el punt l'inflexió de la corba del CPHC després del



d'activitat.

Amb aquests valors s'ha realitzat la prova de la probabilitat exacte de Fisher per tal de trobar si les diferències eren degudes al sexe o a l'atzar. Així, s'ha realitzat la taula de contingència:

	masclès	femelles
CPHC abans AM	0 (A)	6 (B)
CPHC després AM	7 (C)	4 (D)

El resultat ha donat que per a dues cues de significació la probabilitat d'obtenir aquests resultats per atzar és de 0.0339, és a dir que hi ha diferència entre sexes en quant al moment en que es presenta l'inflexió de la corba del CPHC, respecte al mínim d'activitat, fent-ho abans les femelles que els mascles.

#### 4.2.5. VARIACIO DEL RITME AMB L'EDAT

Els animals de la família "3" es van tornar a registrar per un període de 15 dies, a l'any del seu neixement. Dels 5 animals inicials, només es van poder registrar 3, ja que un va morir i en el registre d'un altre hi van haver fallides del sistema de detecció.

La comparació entre animals joves i vells s'ha fet comparant els espectres dels animals #11, #12 i #14 en estat adult i al cap d'un any. Els dos primers animals son dues femelles i el tercer es un mascle.

Es va calcular novament el tau dels animals vells pel període de 15 dies. Els períodegrames dels animals es mostren a les figures 244-246. La femella #11 va incrementar el tau passant de 1510 a 1515 minuts mentre que l'altre femella, #12 va escurçar el tau, passant de 1530 a 1505 minuts. En els dos casos s'observa com el ritme està ben definit sent els pics del períodegrama estadísticament significatius.

El mascle, # 14, no presenta a l'any cap ritme manifest, observant-se una uniformitat en els pics del períodegrama i no resultant cap d'ells significatiu.

La no presència de ritmicitats en el mascle es manifesta també en observar els gràfics d'activitat motora en doble gràfica i la matriu d'espectres. Els dos tipus de representacions es mostren a les figures 247 i 248 respectivament.

### 4.3. CARACTER HEREDITARI DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA

L'estudi del caràcter hereditari del ritme d'activitat motora en rates i la classificació dels animals en la família i generació a la que pertanyen, en base al ritme d'activitat, és una anàlisi complexa que ha comportat la recerca de diferents mètodes d'anàlisi estadística. Degut a que no existeix una metodologia concreta a seguir en un tipus de problema com el present experiment, hem cregut convenient de comentar tots els mètodes que s'han assajat amb els seus avantatges i inconvenients ja que encara que alguns d'ells no hagin donat resultats concluints han servit, a nivell orientatiu per nous enfocaments de l'estudi.

En aquest apartat es poden considerar dos subapartats, el primer, consisteix en l'estudi d'un model multifactorial basat en els paràmetres del ritme com són el tau, l'activitat motora total i el CPH1. L'altre es el que constitueix plenament l'estudi de l'herència del ritme mitjançant l'anàlisi dels patrons individuals per tal de trobar les possibles diferències i semblances entre famílies i generacions.

#### 4.3.1. ANALISI DELS PARAMETRES DEL RITME

L'anàlisi dels paràmetres es va fer mitjançant una anàlisi de la variància d'un model lineal. En aquest model s'ha pres com a resposta el paràmetre a estudiar i com a factors de variació s'han considerat la generació, amb tres nivells, la família, amb 6 nivells i el sexe, amb dos nivells.

##### 4.3.1.1. Tau

L'anàlisi de la variància del  $\tau$ , mostra que hi ha una diferència significativa entre famílies, deguda a la família "2", que té un  $\tau$  superior a la mitjana de les altres. A nivell de generacions, degut a la mateixa família, es troben diferències entre la mitjana de la

segona i tercera generació. En quant a generacions, els valors de la mitjana de cada una de les tres generacions són de 1515 minuts per a la primera, 1524 per a la segona i de 1508 per a la tercera. La diferència entre la segona i la tercera és estadísticament significativa.

#### 4.3.1.2. AMT

Respecte a l'activitat motora no s'observen diferències en quant a generacions. Respecte a la variable família, els resultats mostren com la família "2", presenta valors significativament superiors a la resta ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3.1.3. CPH1

No s'han trobat diferències significatives respecte a aquest paràmetre quan les generacions. Quan a les diferents famílies, s'observa una diferència significativa entre la família "3", que presenta el valor de CPHC més elevat (23%) i la família "1" que té el valor més baix (13%).

### 4.3.2. CARACTER HEREDITARI DEL PATRO DEL RITME

El punt de partida per aquest assaig van ser els espectres mitjans de cada animal. Tal com s'ha comentat anteriorment, aquests espectres mitjans han estat calculats amb els espectres dels animals entre els 24 i 60 dies després del deslletament. Amb aquest interval s'assegura que l'animal hagi adquirit el patró d'adult, amb un ritme circadiari estable i una serie de harmònics ultradiaris que li donen la forma d'ona característica. L'animal #26, va ser registrat només fins al dia 22 pel que no s'ha utilitzat el seu espectre i per tant, la família "5", per a les anàlisis següents, constarà de 4 animals.

La funció d'activitat motora de cada animal ve caracteritzada pel contingut de potència dels 20 harmònics de l'espectre. Per tant es pot considerar que cada rata està definida per un punt en un espai en 20 dimensions (les dimensions de l'espai corresponen al nombre d'harmònics).

Al no poder-se visualitzar punts en 20 dimensions, cal cercar un mètode matemàtic que reculli la informació existent en les 20 variables i les agrupi en dos o tres variables fonamentals que permetin la representació de les dades.

D'altra banda, la reducció de dimensions redueix enormement els temps de càlcul, ja de per sí força llargs. En el cas de passar de 20 a 3 dimensions, el temps de càlcul és aproximadament 40, vegades menor, tot i que ve a ser de 10 vegades més llarg que per a models univariants.

Els espectres de potència dels animals formen una matriu, matriu d'espectres mitjans, de 32 files per 20 columnes, on cada fila correspon a un animal i cada columna a un harmònic.

#### 4.3.2.1. Anàlisi per components principals

La matriu d'espectres mitjans va ser reduïda a dues dimensions mitjançant una anàlisi per components principals, seleccionant la transformació lineal corresponent als dos primers components.

A la taula ## es mostren els valors propis corresponents als 20 nous components obtinguts.

S'observa com només amb els dos primers components ja s'explica un 96% de la variància de la mostra. Això implica que gairebé tota la informació dels 20 harmònics ve explicada per aquestes dues noves dimensions. En la taula 42 es mostren els valors de les coordenades en aquestes dues dimensions obtinguts per a cada un dels animals. La representació gràfica sobre un

plà es mostra a les figures 249-251: Primera generació (1 família), segona generació (2 famílies) i tercera generació (3 famílies). Aquesta gràfica és la projecció sobre el plà de dues dimensions, que deforma menys el núvol original de punts en l'espai de 20 dimensions.

Els individus de la família "1" es troben agrupats en una zona concreta de la gràfica. Només un element, animal #3, està lleugerament separat dels demés.

Els individus de les famílies de la segona generació es troben força ben diferenciats en l'espai exceptuant un element de la família "3" que es troba cap a la zona de la família "2". És curiós de constatar que la família "3" està més desplaçada que la "2" en relació amb la família "1" i que l'individu #3, que es el més desplaçat de la família "1", es el pare de la família "3".

En els individus de la tercera generació no s'observa cap agrupament en l'espai, corresponent a les diferents famílies. Les tres famílies d'aquesta generació presenten els seus elements dispersos en el plà.

#### 4.3.2.2. Espectres mitjans normalitzats

Una segona classificació segons els espectres, es va fer calculant els espectres normalitzats per a cada animal i posteriorment efectuar, com abans, una reducció de dimensions.

Per normalitzar la matriu d'espectres es va calcular previament l'espectre típic de la rata adulta, i la seva desviació estandar, amb tots els espectres que es disposaven de tots els animals en estat adult. Per a cada animal es va restar la mitjana global de cada harmònic del valor obtingut dels harmònics del seu espectre i es va dividir per la desviació estandar de l'harmònic corresponent.

La reducció de dimensions de la matriu normalitzada no va donar resultats positius ja que calien 14 dimensions per tal d'explicar un 95% de la variança. Una representació amb dues dimensions hagués representat, pràcticament, una distribució deguda a l'atzar.

#### 4.3.2.3. Matriu de distàncies euclídiades

S'han calculat les distàncies euclídiades existents entre cada parell de punts en l'espai de 20 dimensions. S'ha obtingut una matriu simètrica de 32\*32. Aquesta matriu es mostra a la taula 43. Els valors d'aquesta matriu representen els quadrats de les distàncies entre cada parell de punts, en l'espai de 20 dimensions.

##### 4.3.2.3.1. Reducció de dimensions

A partir d'aquesta matriu s'ha realitzat una reducció de dimensions. S'ha reduït a tres dimensions ortogonals.

Els valors obtinguts per a cada animal en cada una de les tres dimensions es troben a la taula 44.

La diferència que té la reducció de dimensions sobre la matriu de distàncies respecte l'anàlisi per components principals està en que, els punts mantenen, entre sí, distàncies molt pròximes a les que existeixen quan es troben en l'espai de 20 dimensions. En aquest sentit la deformació és mínima.

De les gràfiques en dues dimensions es dedueixen pràcticament les mateixes observacions que en la representació anterior. S'observa com la família "1" es manté en una zona concreta de la gràfica. La família "2" es troba a la vora d'aquesta i la família "3" està més allunyada de la família "1" cap a un altre quadrant. Un element de la família "3" es troba dins la zona de la família "2". Els individus de la tercera

generació estan totalment escampats per tota la gràfica. La família "6" es la família d'aquesta generació, que presenta els individus més agrupats.

#### 4.3.2.3.1. El.lipses de dispersió dels punts

S'ha representat l'el.lipse de dispersió d'aquests punts segons el centre d'aquests i la seva desviació estàndar.

La representació gràfica de les el.lipses es mostra a les figures 252 segons les famílies, 253, segons les tres generacions, i 254, segons els dos sexes.

Per l'interpretació dels resultats obtinguts s'ha triat les el.lipses representades amb la desviació estàndar en lloc de l'error per què l'error es refereix exclusivament a l'error que es fa en estimar la mitjana, mentre que la desviació estàndar dona informació sobre la variabilitat dels paràmetres a la mostra.

En les el.lipses segons famílies s'observa com la primera família està clarament delimitada en una zona de l'espai, al igual que les famílies "2" i "3", tot i que les el.lipses d'aquestes interseccionen per una zona. La diferència genètica entre les famílies "2" i "3" està en que tenen diferent pare ja que les dues provenen d'una mateixa mare.

Les famílies de la tercera generació presenten una desviació estàndar molt més elevada en comparació amb les dues primeres i es troben les tres el.lipses intersectant entre elles. És interessant de constatar que les famílies "4" i "5" que provenen d'un mateix pare però de mare diferent, presenten una mateixa orientació en l'espai i les el.lipses són molt semblants, mentre que són més diferents entre elles, al menys en quan a orientació, les el.lipses de les famílies "4" i "6" que tenen mare comú i pare diferent.

En les gràfiques segons generacions s'observa que les



el·lipse de la primera i segona generació agrupen bé estàn en una zona concreta de l'espai, agrupant als individus sense gaire dispersió i estàn separades entre elles. En canvi, l'el·lipse dels individus de la tercera generació presenta molta més variança i engloba l'espai de les dues primeres.

En les gràfiques segons sexes no s'observa cap diferència entre les el·lipses dels mascles i de les femelles, les dues es superposen en l'espai.

#### 4.3.2.4. Anàlisi multivariant dels espectres mitjans

Amb els valors de l'espectre mitjà sencer, de cada animal, s'ha realitzat una anàlisi multivariant per models lineals. Com a respostes s'han prè els valors dels continguts de potència dels 20 harmònics i com a factors de variació s'han considerat la generació (tres nivells), família (6 nivells) i sexe (2 nivells). Cada variable és qualitativa, es a dir prè els valors de 1 o 0 segons hi sigui present o no.

L'anàlisi no ha mostrat cap diferència significativa en cap dels tres factors.

#### 4.3.2.5 Funcions de classificació

Un altre mètode assajat per tal de trobar característiques comuns entre els elements de les diferents famílies o generacions, ha estat el càlcul de funcions de classificació. En base a aquestes, en molts cassos s'ha pogut diferenciar entre grups d'animals i caracteritzar un animal de manera individual.

##### 4.3.2.5.1. Classificació entre els individus de les diferents famílies

Les primeres funcions de classificació que es varen

calcular van ser per tal de poder diferenciar els animals d'una mateixa família. Els resultats mostren que realment és possible diferenciar els animals d'una mateixa família en base als seus espectres. En les taules es mostren les funcions de classificació pels animals de cada família, així com les taules de contingència obtingudes en aplicar la funció a cada un dels dies de registre de cada animal de la família. En tots els casos la funció discriminant s'ha obtingut utilitzant només els dies de registre compresos entre el 24 i el 60 després del deslletament per tal d'utilitzar només dies en que l'animal fos adult. Només en la família "4.2" la funció discriminant s'ha fet utilitzant tots els dies de registre de cada animal degut a que es disposaven només de 3 dies de estat propiament adult (25-28). La significació de les taules de contingència s'ha calculat mitjançant una prova de Xi quadrat després d'haver agrupat les freqüències de manera que només hi hagués un 20% de valors inferiors a 5 (Siegel). Si la taula després de les agrupacions resultava de 2\*2 i amb freqüències inferiors a 5, s'utilitzava per el calcul de la significació la prova de la probabilitat exacte de Fisher. No s'ha utilitzat la correcció de Yates ja que no s'ha obtingut cap taula de 2\*2 amb freqüències superiors a 5.

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "1".

classificats com a:

són:

	1	2	3	4	5
1	9	0	0	1	0
2	0	8	1	0	1
3	1	0	9	0	0
4	0	2	1	6	1
5	0	0	1	0	9

columnes: 1+3, 2+4, 5  
files : 2+3+4, 1+5

12	16	2
10	1	9

$\chi^2 = 16.53$   
g.l. = 2  
 $p < 0.05$

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "2".

classificats com a:

són:

	6	7	8	9	10
6	11	1	4	1	13
7	3	9	4	3	2
8	4	2	11	1	1
9	2	2	1	11	5
10	3	3	1	4	10

columnes: 1, 2+3, 4+5  
files : 1+4, 2, 3+5

13	8	20
3	13	5
7	17	16

$\chi^2 = 11.96$   
g.l. = 4  
 $p < 0.05$

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "3".

classificats com a:

son:

	11	12	13	14	15
11	5	5	5	5	4
12	5	15	3	4	1
13	3	2	11	5	5
14	4	3	1	18	2
15	4	2	4	4	7

columnes: 1+3, 2, 4+5

10	5	9
8	15	9
14	2	10
5	3	20
8	2	11

$\chi_i = 34.46$   
 $g.l. = 8$   
 $p < 0.0005$

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "4.1".

classificats  
com a:

son:

	16	17	18
16	13	5	3
17	1	17	2
18	2	3	15

columnes: 1+3

16	5
3	17
17	3

$\chi_i = 46$   
 $g.l. = 4$   
 $p < 0.0005$

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "5".

classificats  
com a:

		24	25	27	28
son:	24	8	0	1	0
	25	0	8	1	0
	27	1	0	8	0
	28	0	0	0	9

columnes: 1+2, 3+4  
files : 1+2, 3+4

16	2
1	17

$p < 10^{-5}$

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA FAMILIA "6".

classificats com a:

		29	30	31	32	33
son:	29	9	0	0	2	1
	30	0	10	1	0	1
	31	1	0	10	0	1
	32	0	4	1	7	0
	33	0	2	1	0	8

columnes: 1+2+5, 3+4  
files : 1, 2+4, 3, 5

10	2
15	9
2	10
8	1

$X_i =$   
g.l. =  
 $p =$

## 4.3.2.5.2. Classificació entre sexes

Per tal de trobar si és possible establir una classificació entre sexes atenent al seu espectre de potència, s'ha calculat una funció de classificació, en base als espectres mitjans, entre els animals de cada sexe.

Els resultats de la classificació es mostren en la taula de contingència:

classificats  
com a:

	F	M
son:		
F	16	2
M	1	13

p =

Aquesta funció, obtinguda amb els espectres mitjans dels animals, s'ha aplicat a cada dia de registre de cada animal. Els resultats obtinguts, només per als dies compressos entre el 24 i el 60 mostren que de 32 animals 18 resulten ben classificats, 5 mal classificats i 9 no es classifiquen. La significació d'aquesta prova s'ha calculat per la prova del signe i pel test de Wilcoxon quantificant les diferències. La probabilitat obtinguda ha estat de . En la taula es mostren els resultats dels dies en que s'han aplicat les funcions de classificació per a cada animal.

#### 4.3.2.5.3. Classificació segons les funcions dels pares

També es van calcular unes funcions que permetessin classificar entre dels animals d'una mateixa família, i aplicar, posteriorment, aquesta funció als fills respectius.

En primer lloc s'han calculat les funcions de classificació entre els animals de la família "1" que tenien descendència. Es a dir entre els animals F1, M3 i M4, pares de la família "2" i la família "3". Les funcions que classifiquen entre els pares aplicades a cada dia de registre dels fills va donar els resultats que es mostren a la taula següent. Igualment, a continuació, es mostren els resultats de la classificació dels fills segons aquesta equació.

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS "PARES" DE LA FAMILIA "1".

classificats  
com a:

	1	3	4
1	10	0	1
3	0	9	1
4	0	0	1

son:

columnes: 1,2+3  
files : 1,2+3

→

10	1
0	20

p =

TAULES DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA SEGONA GENERACIO SEGONS LES FUNCIONS DELS PARES

FAMILIA "2": F1 + M4

classificats com a:

	1	3	4
6	11	2	5
7	8	2	24
8	8	1	9
9	5	2	13
10	2	0	18

columnes: 1+2, 3

13	5
10	24
9	9
7	13
2	18

$X_i = 34.46$   
 $g.l. = 8$   
 $p < 0.0005$

FAMILIA "3" F1 + M3

classificats com a:

	1	3	4
11	10	2	13
12	8	3	18
13	7	0	16
14	10	2	17
15	6	3	16

columnes: 1+2

12	13
11	18
7	16
12	17
9	16

$X_i =$   
 $g.l. =$   
 $p =$



S'ha calculat també, una funció de classificació pels animals de la segona generació que tenien descendència aquests van ser els animals F11, F13, M14 i M15. Els resultats de la classificació es mostren a la taula i també el resultat de la classificació dels animals de la tercera generació segons aquesta equació.

TAULA DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS "PARES" DE LA FAMILIA "3"

classificats com a:

son:

	11	13	14	15
11	5	6	5	3
12	3	13	5	5
13	4	1	19	4
14	3	6	6	10

columnes: 1+2,3,4

11	5	3
16	5	5
5	19	4
9	6	10

$\chi^2 = 23.9$   
 g.l. = 6  
 p < 0.005

TAULES DE CONTINGENCIA RESULTAT DE LA CLASSIFICACIO DELS ANIMALS DE LA TERCERA GENERACIO SEGONS L'EQUACIO DELS PARES.

FAMILIA "4"

	11	13	14	15
son:				
16	3	9	1	8
17	4	7	4	4
18	4	6	4	6
19	1	2	0	1
20	0	1	3	0
21	0	2	2	0
22	0	1	2	1
23	0	1	0	3

Columnes 1+3

4	9	8
8	7	4
8	6	6

FAMILIA "5"

	11	13	14	15
son:				
24	0	3	5	1
25	5	0	2	2
26				
9	1	2	3	3
10	3	2	3	1

## FAMILIA "6"

	11	13	14	15	
29	6	3	1	2	
30	2	5	3	2	
31	4	1	5	2	
32	2	7	1	1	
33	3	1	4	4	

Columnes 1,2,3+4  
Files 1+3,2,4+5

→

10	4	10
2	5	5
5	8	10

Posteriorment s'han assajat noves funcions de classificació per tal de trobar si les famílies podien classificar-se segons un dels dos progenitors. En aquest sentit s'han calculat les funcions de classificació dels dos mascles de la família "1", que van ser posteriorment aplicades a tots els animals de la segona generació. També s'han calculat les funcions de classificació del M14 i el M15 i una funció entre les F11 i F13. Aquestes dues darreres funcions han aplicat, per separat, a tots els dies de registre dels animals de la tercera generació. Els resultats obtinguts mostren que en cap cas ha estat possible classificar als animals segons els pares. Igualment s'ha estudiat si els animals podien classificar de diferent manera, en relació als pares, segons el sexe, però no s'han obtingut diferències significatives en aquest aspecte.

#### 4.3.4.6. Càlcul dels coeficients de variació

El fet de poder discriminar entre els animals d'una mateixa família, indica que el patró del ritme es un paràmetre individual, característic per a cada animal. Per aquest fet es varen calcular quins eren els harmònics que variaven més entre els animals. Aquest càlcul va ser fet a través del càlcul de coeficient de variació de cada harmònic. El coeficient de variació es calcula fent la desviació estandar de cada harmònic dividida per la seva mitjana i multiplicat per 100.

Segons això, veure gràfica els harmònics que presenten més variació són els #2, #6, #8, #15 i #18. Es mateixos resultats en quan als harmònics, s'obtenien si el coeficient de variació es calculava en base a una mitjana ponderada dels harmònics, tenint en compte el nombre de dies dels que venia d'espectre. L'única diferència és en els harmònics #15 i #18 que tenen un coeficient de variació era més baix.

Aquests resultats indiquen que el caracter individual de l'espectre pot venir definit per aquests harmònics ja que son els que més varien d'un animal i altre.

#### 4.3.2.7. Mètodes d'agregació

##### 4.3.2.7.1. Dendograma

Es va realitzar un dendograma per establir una relació de proximitats entre els animals de diferent família. Aquest mètode, molt utilitzat en taxonomia, permet una agrupació jeràrquica de diferents elements en base a una sèrie de caràcters, en el present experiment, en base als harmònics de l'espectre.

El dendograma obtingut de la classificació entre els animals es mostra a la figura 256. Es pot veure com els animals s'agrupen bàsicament en tres grups. En la figura 257 s'observa quins elements de cada família van a cada un dels grups. S'observa com els elements de cada una de les tres primeres famílies tendeixen a agrupar-se cada una en un nucli determinat. Els elements de la tercera generació no estan agrupats segons les famílies sino que es troben dispersos, i es reparteixen entre els tres grups anteriors.

##### 4.3.2.7.2. Agregació limitada

Els mètodes d'agregació han resultat molt adequats per il·lustrar l'agrupació d'elements. S'han assajat dos mètodes. En el primer l'atracció es realitzava considerant la mateixa atracció que hi hauria a l'espai entre cossos de massa 1 que estiguessin a la mateixa distància que els elements de l'experiment. Els resultats van mostrar que aquest mètode no era tant apropiat com es pensava degut a que els cossos adquirien una elevada velocitat, quan estaven pròxims, i en conseqüència no resultaven prou atrets pels demés. Considerant aquests resultats, es va aplicar als punts un altre tipus d'atracció que limita la velocitat dels elements. Així en la figura ### es mostra la representació en el pla, de l'atracció dels elements. Les coordenades són les dues primeres dimensions de la reducció de la matriu de distàncies.

S'han realitzat dos tipus de representacions. Una, (figura 259), mostra la seqüència de moviment dels punts per etapes. En cada quadrat es representa la posició en que quedarien els cossos després d'una iteració, de la posició anterior, amb un salt determinat. En el segon tipus de representació es mostra, de forma continua, la trajectòria que segueixen els diferents elements en el mateix cas anterior (figura 260).

En la representació per passos s'observa com els tres nuclis principals es formen de seguida. Agrupant-se ràpidament els elements de les famílies "2" i "3", cada una en un nucli diferent, excepte un element de la família "3" que s'inclou dins del nucli de la "2". A continuació s'acabaràn d'agrupar els elements de la família "1". Un cop formats els tres nuclis, els elements de la tercera generació s'aniràn agrupant en algú dels nuclis. En la representació continua es mostra la trajectòria dels elements fins a juntar-se en algú dels nuclis.

Al igual que en el cas del dendograma, els elements de les tres primeres generacions s'integren, majoritàriament, cada una en un nucli diferent. Els individus de la tercera generació no es troben agrupats segons la seva família, sino que es troben dispersos entre els tres nuclis.

## 5. DISCUSSIO

### 5.1. EXPERIMENT

Dins de l'apartat de discussió s'ha cregut convenient introduir un apartat sobre el disseny de l'experiment. Com que els experiments sobre estudis evolutius i hereditaris son de llarga durada, és important conèixer les dificultats que hom pot trobar en realitzar un experiment d'aquest tipus.

Aquests experiments obliguen a assegurar durant molt de temps el manteniment de les condicions d'experimentació constants. Aixó implica que moltes vegades poden sorgir dificultats i contratemps que han de ser resolts canviant lleugerament el disseny inicial de l'experiment. En aquests experiments, cada animal està ben caracteritzat per el seu patró d'activitat degut al llarg període de temps de registre. Aquest fet suposa que els animals no poden ser substituïts per altres. La pèrdua d'un animal implicaria tornar a l'inici de l'experiment amb la conseqüent pèrdua de temps de treball. Els principals trets de l'experiment que s'ha cregut convenient comentar, per tal de ser tinguts en compte en experiments d'aquest tipus, són els següents:

#### 5.1.1. LLUM CONSTANT

Tant per l'estudi de l'evolució del ritme d'activitat com pel del caràcter hereditari caldria conèixer quin és el ritme endògen de l'animal. Com que només es possible determinar el ritme manifest, resultat del ritme endògen més les influències externes, es més apropiat determinar el ritme en condicions constants, amb el mínim de variacions possibles. En aquest cas s'està detectant el ritme en curs lliure, reflexe del ritme endògen de l'animal. Es va triar el mantenir els animals sota condicions de LL en lloc de FF, malgrat els inconvenients que presenta, per que les condicions

de FF son més difícils de mantenir. Així en FF sempre que s'hagués entrat a la cambra d'observacions per qualsevol motiu, (neteja de gàbies, creuaments...) s'haguessin alterat les condicions d'il·luminació, cosa que no succeeix en LL. En condicions de FF s'hauria de tenir en compte l'hora d'entrada molt més acuradament ja que polsos de llum influeixen en el ritme de manera molt diferent segons el moment del dia, tal com indiquen les corbes de fase de resposta ( ).

Els inconvenients de mantenir les rates sota LL han estat descrits en diferents treballs. En tots ells s'han estudiat els efectes produïts pel pas de cicles de LF a LL. Així rates adultes criades sota condicions de LF, quan son transferides a condicions de LL mostren alteracions en el ritme circadiari ( ), com poden ser un increment dels harmònics ultradiaris ( ) o fenòmens de dissociació. En alguns cassos el ritme circadiari pot arribar a desaparèixer ( ). També ha estat descrit que adultes transferides a LL presenten problemes en reproduir-se. Un efecte molt diferent succeeix quan les rates son ja criades sota LL, en aquest cas es reproduïxen bé i presenten ritme circadiari. En l'experiment que es presenta es va tenir en compte el ja clàssic experiment d'Aschoff sobre el caràter hereditari dels ritmes ( ) en el que demostrava que ratolins mantinguts sempre sota condicions de LL manifestaven ritmes circadianis durant més de 6 generacions.

### 5.1.2. TALLS DEL SUBMINISTRAMENT ELECTRIC

Al estar els animals en condicions de llum constant, es pot pensar que els talls del corrent elèctric que s'han produït al llarg de l'experiment poden haver actuat sincronitzant als animals. Els resultats mostren com aquest fet no té importància en l'estudi que es pretèn. En condicions de LL els animals segueixen el seu propi ritme en curs lliure, cadascun amb diferent tau, stal com s'observa en la continuïtat de la "columna d'activitat" de les gràfiques dobles. Al no existir una referència temporal, no té sentit el càlcul de



l'acrofase, que es el paràmetre que indicaria una possible sincronització. Tot i així cada vegada que es va tallar el corrent elèctric no es va enregistrar l'activitat motora dels animals durant períodes de 3-4 dies per assegurar que els animals seguien mantenint el propi ritme. Al ser un registre continuat durant molt de temps el rebuig d'alguns dies de registre no influeix en els resultats globals de l'experiment ja que s'han enregistrarat suficients dies per a un estudi exhaustiu de l'evolució del ritme d'activitat i per a caracteritzar de manera precisa, els patrons característics dels animals.

### 5.1.3. MODIFICACIONS DEL DISSENY

A l'inici de l'experiment es va realitzar un calendari en el que els creuaments, neixements i registres d'activitat dels animals anessin seguits i no es perdessin dies entremig. Es pretenia que el darrer dia de registre de l'activitat d'una família, coincidís amb el dia de desalletament de la següent família. En aquest experiment ens hem trobat en les dificultats normals que suposa el seguir un calendari d'aquest tipus. Cal comptar amb un interval de temps, com a marge d'error al temps establert, que és el que tarden els animals en creuar-se, en neixer i en ser desalletats. També s'ha donat el cas que algún creuament no ha pogut tenir lloc, com els programats per la F12, que va ser estèril. En aquests cassos el registre de les famílies anteriors es va continuar durant més temps ja que no calia desocupar les plaques.

En un tipus d'experiment, com el present, en el que cada animal resulta ben caracteritzat pel seu patró d'activitat motora, la mort dels animals suposa un problema afegit, ja que els animals no poden ser suplits per altres. Aquest fet obliga també a un replantejament dels nous creuaments que han de tenir lloc.

En estudis llargs cal tenir present el temps de vida dels animals. Així, el temps de vida d'una rata de

laboratori, pot arribar a ser de tres anys. El que succeeix es que la majoria d'ells desenvolupen malalties respiratòries cròniques que causen dany al teixit pulmonar, es per aixó que poques d'elles sobreviuen a un any i mig o dos anys d'edat. Alguns treballs indiquen que les rates Sprague-Dawley en un 50% no sobreviuen a l'any de vida ( ). Per aquest motiu es pot considerar, a efectes pràctics que una rata es vella a partir de l'any d'edat.

#### 5.1.4. PARENTIU DE LES RATES

El fet que totes les rates provenien en darrer terme d'una sola parella, produeix una certa dificultat a l'hora d'establir diferències entre famílies i generacions, atesa la seva gran semblança. Es difícil, en aquest cas, poder definir patrons característics de grups. Aquest fet ha obligat a cuidar especialment l'apartat de tècniques estadístiques per tal de detectar i estimar les petites diferències existents entre el patró del ritme dels diferents grups d'animals.

D'altre banda, pero, aquesta semblança de caracters entre els animals es util per l'estudi de l'evolució del patró del ritme ja que dona un grup força homogeni d'animals que són representatius de les rates utilitzades en el nostre laboratori.

#### 5.1.5. SINCRONITZACIO ENTRE ELS ANIMALS

Fel fet d'estar molts animals en una mateixa habitació, tot i que en gàbies separades, no es pot descartar la possibilitat de que aquests animals hagin sincronitzat els ritmes, fet que es troba ampliament descrit en la bibliografia (38,95,191). Es per aixó que es va realitzar un estudi previ sobre aquest punt. Els animals de la família "3" varen estar en la mateixa habitació del dia 64 al 78 amb altres rates de ritme molt diferent al seu, per les condicions en que havien

estat criades i per que no tenien cap parentiu amb elles. Els resultats d'aquest assaig previ no estan descrits en l'apartat de resultats degut a que no es va trobar que el ritme de les rates de la família "3" fos alterat, de manera significativa, per les rates noves.

No es varen trobar diferències en quant al valor del tau, ni en quant al patró típic de l'espectre (les comparacions van ser fetes per un test Xi quadrat amb  $p > 0.05$ ). Tampoc s'observen variacions en les gràfiques d'activitat motora continua i en les evolucions dels espectres de potència del dia 64 al 78.

Es un fet comprovat que els animals que viuen en una mateixa habitació poden sincronitzar els ritmes entre ells. Els nostres resultats no són contraris a aquesta afirmació. El que succeeix es que la sincronització no afecta al nivell que estudiem. Es lògic suposar que la sincronització fes canviar o inclús, coincidir el valor de la acrofase però no te per que fer variar la forma de la funció. La forma de la funció és un paràmetre propi de cada animal. Al estar els animals en LL, tal com s'ha comentat, no te sentit el càlcul de la acrofase ja que no hi ha moment del dia de referència i tampoc en te calcúlar la diferència de fase entre els ritmes dels animals ja que cadascun segueix el seu propi període.

A la vista dels resultats obtinguts es pot pensar que tot i que els animals poden haver sincronitzat entre ells, la presència d'altres animals a la cambra d'observació no afecta als objectius de l'experiment d'establir el patró típic de cada animal i veure l'evolució del ritme d'activitat.

Cal dir que així com hi ha una gran quantitat de bibliografia en quant als diferents ritmes de l'organisme i a les alteracions que poden presentar, n'hi ha molt poca en quant a l'evolució dels ritmes i encara menys pel que fa al caracter hereditari del patró del ritme. Per aquest motiu ens hem trobat en alguns aspectes amb manca de dades bibliografiques amb les que contrastar els nostres resultats.

## 5.2. PERIODE ENDOGEN, TAU

El ritme d'activitat motora de la rata en LL, segueix un període superior a les 24 hores, ja que és un animal nocturn (9,180). S'ha descrit que el tau és un valor d'espècie i que la distribució dels valors individuals oscil·la al voltant d'una mitjana. Els resultats obtinguts coincideixen amb aquestes afirmacions ja que la distribució de freqüències dels valors s'ajusta a una funció normal de mitjana 1514 minuts i desviació estàndar de 19 minuts.

Tal com s'ha comentat en l'apartat de resultats, el tau ha estat calculat utilitzant tots els dies de registre de que es disposa. Les diferències de calcular el tau utilitzant tots els dies o utilitzant-ne només 15 està, no tant en el valor del tau, que gairebé és el mateix, sinó en l'increment en la significació dels pics del periodograma. Aquest fet indica que encara que a l'inici del registre dels animals, el ritme d'activitat motora sigui clarament ultradiari, els animals porten implícits en el seu patró d'activitat els components circadianis que determinaran el ritme propi de l'estat adult.

Aquest fet implica que els components rítmics que configuren el ritme circadiari de la rata venen ja determinats des de que l'animal es petit, potser des del moment del neixement o abans, indicant una predisposició genètica a adquirir un ritme, i un valor de tau determinat.

Des de fa temps, la llargada del tau està considerada que ve determinada genèticament ( ). Diferents soques d'animals amb diferents taus , en creuar-se entre elles donen generacions que presenten uns valors de tau entre les dues soques progenitores. Aquest fet indica que el tau ve determinat per més d'un cromosoma ja que es poden obtenir caràcters intermedis. En el nostre cas al ser tots els animals de la mateixa espècie, i soca, no es poden trobar diferències entre ells en quant al valor de  $\tau$ .

### 5.3. EVOLUCIO DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA

En aquest treball s'ha trobat que el ritme d'activitat motora evoluciona des del desalletament en tres fases:

Una primera on els moviments estan distribuïts tot al llarg del dia d'una manera quasi uniforme. Aquesta zona d'aparent arritmicitat queda reflexada en els espectres de potència on s'observen uns valors elevats dels harmònics ultradiaris. També en les gràfiques dobles s'observa com la primera zona presenta una distribució de moviments uniformement repartida tot al llarg del dia. Aquest fet fa pensar en que en la primera etapa de vida dels animals el ritme d'activitat motora vingui regit per ritmes d'alta freqüència o per ritmes circadianis no acoblats entre ells.

Tot i que no s'han trobat diferències en quant al valor del contingut de potència de l'harmònic circadiari, si que s'han trobat diferències entre famílies en quan al dia en que l'harmònic 1 comença a presentar-se. Així, la família "1" presenta un CPH1 clarament superior als demés a partir del dia 10 (8 en les femelles i 14 en els mascles), mentre que en la resta de famílies el CPH1 es el més important a partir del dia 22. Aquesta diferència entre el dia d'aparició, pot ser deguda a que la família "1" es la primera en estar en llum constant i els seus pares havien encara estat criats sota cicles de llum-fosc. Aquesta hipòtesi és ben

factible ja que, encara que els pares de la família "1" hagin estat sota LL des del moment del creuament, cal tenir present que ells post-efectes de cicles de llum-fosc que poden durar fins a 100 dies (180, 181). Segons això, la mare de la família "1", durant el període de gestació i alletament podia haver estat influïda pel fet d'haver estat criada sota LD.

En una segona fase, es troba una disminució d'activitat motora al mateix temps que el ritme encara segueix presentant components ultradiaris. Aquesta fase reflexa un fet que encara, no ha estat descrit. Quan l'harmònic circadiari passa a ser el component principal de l'espectre, hi ha una variació en la quantitat total d'activitat motora. Aquest fet serà comentat específicament en el següent apartat.

En la tercera fase el ritme d'activitat es ja clarament circadiari. En aquesta fase l'harmònic principal de l'espectre es l'harmònic 1. L'activitat motora total torna als seus nivells inicials.

Es important tenir en compte que els patrons adults queden configurats a partir dels 22-25 dies després del desalletament. En aquests dies, els continguts de potència, tant dels harmònics ultradiaris com del circadiari, estant ja totalment definits. L'espectre de potència ens permet conèixer de manera força exacta la forma del patró del ritme. Cal tenir present que l'espectre per a cada animal està definit pel seu propi tau. Això implica que la llargada de cada harmònic varia segons cada individu.

Aquest fet és important ja que indica que els animals no adquireixen tots el mateix període, però sí que assolixen tots un ritme circadiari. El patró del ritme està també caracteritzat per una colla d'harmònics ultradiaris que no coincideixen en llargada entre tots els animals, ja que estan en funció de l'harmònic 1 de cada espectre es a dir del  $\tau$  de cada rata.

Tot això ve a indicar que els animals adquireixen cadascun el seu propi tau, però que la comparació entre els diferents patrons de ritmes s'ha de fer en base al espectre de potències considerant els harmònics com a tals i no com el valor en minuts dels períodes d'aquests harmònics.

Dins l'evolució de l'espectre es important a destacar el fet que el pas de ser els harmònics del 7 al 9 els més importants en els primers dies del registre, a ser l'H1 el més important, quan l'animal es ja adult, es produeix sobtadament. Es a dir, el ritme circadiari no s'adquireix per adaptació a algun possible ritme circadiari, ja que sino s'observaria un desplaçament de l'harmònic més important, passant per tots els harmònics entremig del 8 al 1. Això indica que no tots els harmònics són iguals en importància. Segons l'epoca de vida de l'animal es manifesten uns o altres i aquest fet ja ve, probablement, determinat en la configuració genètica del animal.

S'ha observat també que l'evolució de l'espectre té molt més sentit quan s'analitza l'espectre mitjà de tots els animals junts, o d'un grup concret d'animals, que observant l'evolució de l'espectre individualment. Això es degut a que l'espectre presenta moltes variacions individuals dia a dia i en una mitjana les variacions no significatives queden compensades.

Així doncs l'espectre mitjà dels animals adults queda definit per un valor del CPHC comprés entre 17-19 % i com a components ultradiaris valors de 4-7% per els harmònics 5,6,7 i 9. La potència del reste d'harmònics es considera soroll de fons.

### 5.3.1. EVOLUCIO DEL CPH1 I CPH8 AMB EL TEMPS

Les evolucions dels CPH1 i CPH8 amb el temps presenten una tendència comú, encara que a l'inversa. Mentre l'un augmenta, l'altre disminueix. En cap dels dos casos s'han calculat les funcions d'ajust dels paràmetres de manera individual per a cada animal. Això es per que el que realment interessa conèixer són les tendències dels grups d'animals i més encara si es té en compte la gran variació que hi ha entre els valors d'un mateix harmònic dia a dia en un mateix animal.

Per això les funcions d'ajust serviràn per a observar la tendència d'un grup d'animals. Fent corbes individuals podria donarse el cas que un dia es presentés un valor molt elevat de l'harmònic i la corba, sobre tot la seva asymptota, dongués lloc a interpretacions errònies de les dades. En una mitjana per grup, aquestes variacions queden compensades.

Respecte a la corba d'ajust de l'activitat motora total cal dir que abans d'assajar la "normal invertida" el millor ajust corresponia a una funció lineal i de valors gairebé constant durant tot l'experiment. Logicament, l'activitat motora d'un animal des de que neix fins que es adult ha d'anar augmentant. Observant les gràfiques es veu com hi ha un petit període just a l'inici del registre en que l'activitat incrementa. Aquest augment pot indicar que l'increment d'activitat té lloc mentre l'animal encara està amb la mare i fins a 4-5 dies després del desalletament. Després d'això l'activitat motora s'estabilitza i es manté constant.

A part de l'augment inicial, l'activitat motora mostra un decrement a diferents dies per a cada animal. Aquest decrement està correlacionat amb l'etapa de baixa activitat motora observada en les gràfiques dobles. Els dies de baixa activitat són diferents per cada animal pel que l'ajust a la funció que es va idear es va haver de fer de manera individual. El model matemàtic creat es vàlid per a tots els animals, però només pot ser



aplicat a cada animal individualment, ja que cada animal té els seus dies particulars on decreixen els valors d'activitat, i el dia propi en que retorna als nivells inicials altre vegada.

### 5.3.2. RELACIO ENTRE AMT I CPHC

El resultat més important que es pot treure de l'estudi de l'evolució del RAM, en el present experiment i que no ha estat fins ara descrit en la bibliografia, és el fet que l'aparició de l'harmònic circadiari com a component principal de l'espectre ve acompanyat per canvis en l'activitat motora total.

S'ha trobat com gairebé paral·lelament a la disminució d'activitat motora es presenta l'inflexió de la corba d'ajust asimptòtica per al CPH1.

La causa d'aquest fenomen no es coneix i no s'ha trobat en la bibliografia cap descripció similar.

S'ha tingut ocasió de poder comentar aquest resultat amb alguns especialistes dins del camp de la cronobiologia (Prof F. Halberg, Dr. M.C. Moore-Ede, Dr. Z. Boulos). Alguns comentaris al respecte han suggerit la possibilitat que aquest fenomen estigués relacionat amb el sistema endocrí, concretament amb la quantitat de melatonina secretada per la pineal. Un altre possible explicació proposada és que mentre la rata creix manifesta canvis en la sensibilitat a la llum en els cons. Segons això, el decrement d'activitat estaria relacionat amb un període en que la sensibilitat a la llum fos mínima (màxima per ser animals nocturns). Tot i així amb aquesta suposició no s'explica per que la disminució d'activitat té relació amb l'aparició del ritme.

Per la nostre banda creiem que la baixada d'activitat pugui tenir relació amb els fenòmens d'acoblament entre els diferents oscil·ladors que regulen el ritme

circadiari d'activitat motora de la rata. Aquest quedaria explicat de la següent manera:

Es un fet conegut que quan l'animal es jove, el seu sistema circadiari té un funcionament diferent al de l'estat adult. Ha de transcorre un període de temps abans no s'adquireix el ritme propi d'adult.

Segons això, el que pot succeir és que, inicialment, els oscil·ladors que regulen el ritme funcionen desacoblament, seguint cadascun el seu propi període. Aquest desacoblament donaria lloc a l'aparent arritmicitat de les rates en la primera fase després del desalletament. A mida que l'animal va creixent, i madura el sistema nerviós, els oscil·ladors es van acoblant entre ells. Aquest acoblament pot produir un consum extra d'energia i provocar una disminució en l'activitat motora. Per últim, quan tots els oscil·ladors estiguessin perfectament acoblats, funcionant com a un únic oscil·lador, o marcapassos, seria quan es possaria de manifest el propi ritme circadiari d'activitat, retornant aquesta a uns nivells més elevats, ja que el manteniment de l'oscil·lació comporta un menor consum d'energia (83).

Si el ritme d'activitat motora ve controlat per el NSQ (232,208), i aquest manifesta la seva activitat rítmica circadiana ja des del moment, o abans dels naixement, cal pensar en una explicació pels 40 dies de retràs en que es presenta el ritme d'activitat motora com a circadiari.

Aquest fet pot ser degut a que hi hagi alguna estructura que actui com a oscil·lador circadiari secundari, es a dir rebí les influències rítmiques del NSQ, per tant ell també sigui rítmic i per tant es produeixi el ritme d'activitat motora. El retràs podria ser degut a la manca de maduració d'aquesta estructura o a la manca de connexions amb el NSQ. No hem trobat treballs que apuntin cap a una estructura concreta per regir el ritme d'activitat. Pittendrigh (177) va proposar que una doble oscil·lació que observava en el

RAM de hamsters podia ser deguda a l'acció de 2 oscil·ladors, es a dir que la possibilitat de l'estructura secundària no pot rebutjar-se.

Tot i així, Es molt probable que l'activitat motora estigui controlada per una gran quantitat d'estructures, ja que en certa manera es pot considerar relacionada amb l'energia consumida per l'organisme.

### 5.2.3. VARIACIO DEL RITME AMB LA EDAT

Existeix gran quantitat de bibliografia sobre la variació del ritme en animals vells. En aquest sentit s'han descrit fenòmen de desincronització (263) i d'alteracions del tau. El tau, o període endògen, es un paràmetre característic de cada individu, que es manté gairebé constant tot al llarg de la vida del animal si es manté en les mateixes condicions ambientals. Tot i així, s'ha trobat que el ritme varia amb la edat, encara que els resultats no són massa clars. S'han descrit tant allargaments com escurçaments del tau amb la edat i per ara sembla ser que això varia segons el ritme de que és tracti i segons els diferents autors (180,263).

En el present experiment no s'han trobat diferències significatives sobre l'influència de la edat en la llargada del tau. El fet que es important de destacar és l'aritmicitat del mascle a l'any de vida. La pèrdua del ritme d'activitat en mascles aïllats des del desalletament va ser observada en experiments previs amb ratolins en condicions de llum-fosc (58). En aquests experiments ja només als 100 dies després del desalletament el mascle presentava més components ultradiaris que les femelles, mentre que aquestes seguien mantenint un ritme circadiari estable.

Aquest fet, encara que cal confirmar-lo degut al poc nombre d'animals en que s'ha observat, sugereix que els mascles presenten un sistema circadiari menys estable i

poden perdre el ritme circadiari amb més facilitat que les femelles.

#### 5.4. DIFERENCIES ENTRE SEXES

En aquest treball s'ha calculat quins són els harmònics que presenten un valor de coeficient de variació més gran en discriminar entre sexes. Aquests harmònics representen els harmònics que més varien entre els dos sexes. Per tant, les diferències entre sexes cal cercar-les a nivell d'aquests harmònics. La caracterització dels dos sexes mitjançant una funció discriminant basada en el càlcul dels harmònics havia estat descrita en altres treballs en el nostre departament (61) en ratolins, on va resultar que els harmònics que permetien classificar entre sexes eren el #4, #7, #13 i #17. Aquests harmònics corresponen amb les zones de màxim coeficient de variació dels harmònics del present experiment. Encara que els dos treballs hagin estat fets amb espècies diferents i en condicions d'il·luminació diferents mostren que dins l'espectre dels animals hi ha unes zones que permeten diferenciar entre sexes. Aquestes zones han coincidit en els dos casos.

Els harmònics que han permès establir una diferència entre els dos sexes són harmònics de poca importància a nivell evolutiu, que pràcticament no varien en contingut de potència en el temps i que respecte als demés harmònics són poc significatius.

També ha estat possible diferenciar entre els espectres de mascles i femelles pel càlcul d'una funció de classificació. La diferenciació indica que en els espectres dels animals de cada sexe ha d'haver-hi alguns caràcters que determinin un patró específic per a cada sexe. El fet que la classificació per sexes hagi resultat força significativa havent estat calculada en base a l'espectre mitjà de cada animal implica que els caràcters de la forma d'ona propis de cada sexe estan

clarament definits en els espectres de potència ja que no s'anulen, sino al contrari, es potencien en considerar la mitjana de l'espectre.

El poder establir una funció de classificació entre els animals dels dos sexes prova que tots els animals tenen un ritme circadiari i que per a diferenciar entre ells cal recórrer a la forma de la funció, a través dels harmònics ultradiaris.

Diferències entre sexes en quant a la forma d'ona ja han estat definides (275), sobre tot en base als harmònics ultradiaris, tot i així els autors no troben diferències en LL. També s'ha trobat diferències entre sexes en quant al sistema circadiari de mamífers, concretament en hamsters (282).

En el present experiment la classificació resulta significativa quan els animals son ja adults, a partir del dia 24 després del desalletament, no en canvi, quan les rates son joves. Abans del dia 24 les femelles no resulten ben classificades com a tals, si en canvi els mascles, utilitzant la mateixa funció per els dos períodes de temps. Aixó indicaria que el caracter de "femella" s'adquireix més tard que el de "mascle" ja que aquests resulten ben classificats ja els primers dies. Aquest caracter es indepenent de l'aparició del ritme circadiari i ve representat pels harmònics ultradiaris.

També s'han trobat diferències en quant a a l'evolució del contingut de potència respecte al temps. En aquest aspecte hem trobat com les femelles adquireixen un CPHC més elevat que els mascles a igualtat de temps, fins aproximadament 30 dies després del desalletament. Després els CPHC de cada sexe es van igualant, tot i que la corba d'ajust de l'evolució del CPHC dels mascles no s'arriba a assolir en el temps registrat. Aquest fet indica que les femelles son circadianes abans que els mascles. En aquest aspecte, potser es podria considerar que maduren abans ja que assoleixen

primer el patró d'adult. Tot i així, són els mascles els que assoleixen primer la maduresa sexual.

### 5.5. CARACTER HEREDITARI

El concepte d'herència suposa la transmissió d'una sèrie de caràcters, tant físics com psíquics o de comportament, d'uns individus als seus descendents a través de material genètic. En quant als ritmes, està ben reconegut el fet que es transmeten mitjançant gens. En Drosophila Melanogaster s'ha proposat un locus del cromosoma X en el que es localitzaria el gen del regulador de temps. En organismes superiors no s'ha pogut determinar la genètica de la transmissió de ritmes tot i que el caràcter hereditari dels ritmes està ben reconegut. El reconeixement ve donat sobre tot per estudis en els que s'han trobat diferències en quant a ritmes en animals d'una mateixa espècie de diferent estructura genètica, com són mutants (130) i soques diferents (32).

En aquest treball s'han posat a punt i assajat diverses tècniques estadístiques per tal de determinar la naturalesa hereditària del ritme d'activitat. La recerca del caràcter hereditari ha consistit en intentar establir el ritme típic de cada grup d'animals (sigui família o generació) i poder d'alguna manera diferenciar o trobar semblances entre ells. Degut a la consanguinitat dels animals, establir diferències entre grups d'animals es difícil i ha requerit tècniques d'anàlisi força sofisticades.

Totes les tècniques d'anàlisi s'han fet en base als valors dels espectres de potència dels animals. La tècnica d'anàlisi espectral o descomposició per sèries de Fourier ha resultat apropiada per a l'estudi del caràcter hereditari, ja que mostra el patró típic de la funció d'activitat. L'harmònic circadiari en si, dona

poca informació sobre la transmissió de caràcters entre generacions d'animals. Això s'explica com que el ritme circadiari és un paràmetre d'especie. Les característiques particulars del ritme s'han de buscar en els harmònics ultradiaris ja que són els que defineixen la forma de la funció.

Els resultats de l'experiment mostren com existeix un component genètic que determina el patró del ritme d'activitat. Això es dedueix de que els animals es poden agrupar per famílies en funció del seu espectre. Un altre fet a destacar es que els animals de la tercera generació no poden agrupar-se per famílies i es distribueixen entre els grups de les demés famílies. Això indica que els caràcters que defineixen el ritme es transmeten a través de les generacions. Així la tercera generació té més variabilitat entre els seus elements degut a que aquests presenten més dispersió en els de caràcters hereditaris. Aquest fet ve recolzat per l'augment que s'observa en la variació entorn els centroides de cada generació.

### 5.5.2. METODOLOGIA

En el camp que es tracta no estan encara establertes les metodologies apropiades per a l'estudi del caràcter hereditari. Es per això que en aquest treball s'han assajat diverses tècniques matemàtiques aplicades sobre els mateixos animals. S'ha pretés fer una anàlisi de les metodologies existent i comprovar el resultat de cada un d'elles sobre els animals que disposavem per comprovar la repetitivitat o no dels resultats. Cada tècnica utilitzada en l'anàlisi del caràcter hereditari del ritme és apropiada per un camp concret dins la classificació dels animals. A continuació s'exposarà l'utilitat de cada mètode i si ha resultat apropiat o no en el present treball.

5.5.2.1. Anàlisi per models lineals dels paràmetres del ritme.

En el nostre cas una anàlisi per models lineals de cada paràmetre del ritme no ha donat cap diferència significativa. Aquest fet, en part ja esperat, es degut a que els paràmetres que defineixen el ritme circadiari, considerats per separat, tals com la quantitat d'activitat diària, el tau o el CPHC son més aviat paràmetres propis d'especie, o com a mínim de soca, pel que practicament es impossible establir diferències en animals tant semblants.

En aquest sentit té més sentit una anàlisi multivariant en el que intervenen, al mateix temps, molts més paràmetres. En el nostre cas sobretot té importància el poder determinar tota la forma de l'espectre per trobar les possibles diferències. Es per aixó que s'ha assajat l'anàlisi multivariant amb tots els harmònics de l'espectre.

5.5.2.2. Anàlisi de components principals

Aquest mètode ha permès reduir el nombre de variables a estudiar (20 harmònics) a un nombre més reduït (2 components) i de més fàcil interpretació sense alterar gairebé l'estructura de la variabilitat dins la mostra.

El fet de que en les gràfiques s'observin els elements de la primera i segona generacions agrupats i els de la tercera al voltant d'aquests i dispersos per tot l'espai fa pensar en que els caràcters de les famílies dels pares queden dispersos en els animals de la tercera generació. Aquesta tècnica ha estat adequada per a fer una primera aproximació visual.



### 5.5.2.3. Anàlisi de les distàncies euclídiades

El millor mètode per observar les proximitats entre els animals i representar-les de manera visual en un pla ha estat pel càlcul de la matriu de distàncies euclídiades i posterior reducció de dimensions. Els gràfics, tot i que donen agrupaments semblants als obtinguts per l'anàlisi de components principals donen una representació més exacta de la realitat ja que en aquesta representació els animals mostren distàncies molt pròximes a les que existirien entre ells en un espai de 20 dimensions.

Si es representen les el·lipses de dispersió de les diferents famílies i generacions s'observa com les el·lipses de les dues primeres generacions estan ben definides i separades entre elles. En canvi, l'el·lipse dels animals de la tercera generació presenta més variació que les altres i les engloba en la seva àrea. Aquest fet suggereix que en el pas a la tercera generació es produeix una dispersió de caràcters. En estudis genètics, es freqüentament avaluar l'augment de la variància de les darreres generacions respecte a la primera. Es considera que el caràcter es va dispersant en les successives generacions. Això explicaria el perquè els animals de la tercera generació estan més dispersos que els demés. Si realment el ritme es hereditari, en la tercera generació apareixerien barrejades característiques de les dues primeres amb el que la dispersió augmenta.

### 5.5.2.3. Agregació gravitatòria

El mètode d'agregar els punts corresponents als animals en la seva matriu de distàncies projectada en dues o tres dimensions, segons el cas, ha permès establir una sèrie de grups segons les proximitats en l'espai.

Aquest mètode ha permès trobar d'una manera molt

gràfica quina seria l'atracció entre els punts segons la proximitat en l'espai de dos dimensions. Els resultats han mostrat com de seguida apareixen els nuclis principals de manera molt clara. Igualment s'observa bé com un cop formats els nuclis principals la resta d'elements tendeixen a agrupar-se en torn d'ells.

#### 5.5.2.4. Dendograma

L'utilització de dendogrames es una tècnica molt freqüent en estudis de taxonomia. Aquest mètode es basa en establir una classificació jeràrquica entre els elements, de manera que els elements que s'uneixen més tard són els que tenen menys caràcters comuns. En aquest treball s'ha assajat per trobar caràcters hereditaris. Els animals de les tres primeres generacions s'agrupen en tres grups segons la família. En canvi els elements de la tercera generació no s'han agrupat segons famílies. Aquest fet es degut a que aquest mètode es basa en l'agrupament de punts propers en l'espai i els animals de la tercera generació estan totalment dispersos. Es per aixó que moltes vegades un element en l'espai es trobarà molt més a la vora d'un element d'un altre família que de la seva pròpia. Per aixó aquest mètode no pot ser aplicat en qualsevol estudi de caràcter hereditari, però és molt útil per a separar entre grups amb un caràcter determinat.

#### 5.5.2.6. Funció de classificació

El darrer mètode assajat ha estat el càlcul de funcions de classificació entre els animals.

De totes les anàlisis fetes, el tret més significatiu ha estat la possibilitat de poder classificar entre els animals en base als espectres dels individus de cada família. Aquest fet és important per que reflexa

el caracter individual del ritme. Cada individu, presenta el seu ritme caracteristic indepenentment de les condicions ambientals, ja que han estat les mateixes en tots els cassos. El tau dels animals ja havia estat definit com a característica individual (180) dificilment inalterable. En aquest treball hem trobat que l'espectre de potència, que caracteritza la forma del ritme es propi de cada individu. El patró del ritme vé definit, des de que l'animal és petit, probablement de manera prefixada geneticament.

## 6. CONCLUSIONS

Dels resultats que s'han exposat es poden treure les següents conclusions.

6.1. EL RITME D'ACTIVITAT MOTORA DE LA RATA NASCUTA I CRIADA EN CONDICIONS D'IL·LUMINACIÓ CONSTANT ESTÀ FORMAT PER COMPONENTS ULTRADIARIS DELS DIES 21 AL 42 D'EDAT.

En aquesta etapa la rata manifesta ritmes ultradiaris de períodes entre 3 i 4 hores. Aquest fet es posa de manifest per la predominança dels harmònics de l'espectre compresos entre el 7 i el 9.

6.2. EL COMPONENT CIRCADIARI DE L'ESPECTRE ES MANIFESTA DE FORMA EVIDENT A PARTIR DEL DIA 32 D'EDAT, PERO EL RITME NO ES CLARAMENT CIRCADIARI FINS A PARTIR DEL DIA 42.

Aquest fet pot estar relacionat amb la maduresa de l'animal, tot i que amb un petit retard. Sexualment, la rata es considera madura a partir de la tercera setmana de vida. Si, tal com ha estat proposat per altres autors, el cicle estral de les femelles és de naturalesa circadiària, l'adquisició del ritme circadiari podria considerar-se com a senyal de la maduresa i del caràcter adult de l'animal.

6.3. L'ESPECTRE CARACTERÍSTIC DE LA RATA ADULTA EN CONDICIONS D'IL·LUMINACIÓ CONSTANT ESTÀ FORMAT PER UN 19% DE POTÈNCIA EN L'HARMÒNIC CIRCADIARI I UN 6-7% DE POTÈNCIA EN ELS HARMÒNICS 5 I 6.

L'espectre de l'animal adult indica que la rata té un ritme circadiari manifest. Els harmònics ultradiaris són els que donen la forma característica a la funció circadiana. Es pot constatar que els components ultradiaris predominants en l'estat adult no són els mateixos que presenten quan l'animal és petit, sinó que són harmònics de freqüències una mica més baixes.

6.4. LA FORMA DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA ES INDEPENDENT DEL TAU DE L'ANIMAL.

Encara que cada rata segueix un ritme d'activitat de període diferent al de les altres i l'espectre de potència s'ha calculat en base al propi període, la forma d'ona ve definida pels mateixos harmònics en tots els animals. Aquest fet indica que no és tant important el període que segueix l'animal com la forma de la funció que es presenta.

6.5. LA FORMA DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA DE LA RATA ES CARACTERISTICA DE CADA ANIMAL.

Aquest fet s'ha demostrat en poder classificar cada animal en base al seu espectre de potència, mitjançant una sèrie de funcions de classificació. Això indica que els components que regeixen el ritme venen definits segons les característiques particulars de cada animal, ja que tots ells han estat en les mateixes condicions de manteniment.

6.6. L'INCREMENT DEL CPHC ES PRODUEIX JUNTAMENT AMB UN DESCENS EN LA POTENCIA DELS HARMONICS ULTRADIARIS QUE FREDDOMINEN EN LA PRIMERA FASE DE L'AILLAMENT.

L'aparició del ritme circadiari no es produeix com a

conseqüència d'una adaptació a algun possible ritme extern. En aquest cas s'hagués observat com la potència més elevada hagués estat entre tots els harmònics compresos entre el 8 i el 1. Probablement hi ha uns components genètics que fan que els harmònics importants siguin concretamet uns, a nivell ultradiari, quan l'animal es petit i el circadiari quan és adult. La transició d'un a l'altre es produeix sobtadament.

#### 6.7. EL CPHC EVOLUCIONA SEGONS UNA FUNCIO ASIMPTOTICA.

Inicialment els valors del CPHC són molt baixos i van augmentant amb el temps tendint a un valor asimptòtic. La funció utilitzada per ajustar els punts experimentals presenta una inflexió, que s'ha produït d'una manera brusca en tots els casos. Aquest fet indica la transició sobtada entre l'estat anterior i l'establiment del ritme circadiari.

#### 6.8. L'APARICIO DEL RITME CIRCADIARI EN LA RATA VA ACOMPANYADA PER UN DESCENS EN L'ACTIVITAT MOTORA TOTAL.

Quan l'animal adquireix el ritme circadiari es produeix un descens en l'activitat motora total. Quan l'animal ha adquirit definitivament el ritme, es tornen a recuperar els nivells inicials d'activitat. Es suggereix que aquest fet pot estar relacionat amb un consum extra d'energia produït per l'acoblament entre els oscil·ladors que regeixen el ritme d'activitat. S'ha pogut ajustar aquesta corba a una funció matemàtica que presenta un mínim en uns dies determinats i que quan recupera els nivell inicials els manté de manera gaire bé constant durant tot el temps que ha durat el registre.

6.9. S'HA DEFINIT UN ESTADÍSTIC ESPECÍFIC PER A PROVAR L'EVOLUCIÓ CONJUNTA DE L'AMT I EL CPHC.

Per a estudiar la hipòtesi plantejada no es disposava de cap metodologia concreta. La definició de l'estadístic A ha resultat un bon mètode per a quantificar l'existència d'un descens d'activitat associat a l'aparició del ritme circadiari.

6.10. EL DESCENS DE L'ACTIVITAT MOTORA PRODUIX DURANT L'APARICIÓ DE L'HARMONIC CIRCADIARI ES MANIFESTA EN UNS DIES DETERMINATS, CARACTERÍSTICS PER A CADA ANIMAL.

Aproximadament per a tots els animals el descens d'activitat motora es produeix entre els dies 28 i 41 d'edat. No obstant això, cada animal presenta el mínim d'activitat motora en uns dies determinats que poden venir definits genèticament i segons el grau de maduració de l'animal. Degut a aquest motiu no és possible fer una mitjana de l'evolució de l'activitat entre tots els animals, ja que dona valors gairebé constant i no es pot observar aquest fenomen.

6.11. LA RELACIÓ EN EL TEMPS ENTRE EL DESCENS DE L'ACTIVITAT MOTORA TOTAL I LA INFLEXIÓ EN LA CORBA D'EVOLUCIÓ DEL CPHC ES DIFERENT SEGONS ELS SEXES.

S'ha trobat que les femelles presenten la inflexió en la corba d'evolució del CPHC abans que el descens en la corba d'activitat motora. Els mascles, al contrari, presenten la inflexió en la corba d'activitat abans que el descens d'activitat. Aquest fet indica que les femelles adquireixen abans que els mascles el caràcter circadiari.

6.12. LES FEMELLES PRESENTEN ABANS QUE ELS MASCLES VALORS MES ELEVATS DEL CPHC.

Alguns autors han demostrat que les femelles són més circadiàries que els mascles i que aquests presenten més components ultradiaris. En l'experiment hem trobat diferències quan a l'adquisició del component circadiari que es dona abans en les femelles.

6.13. LA FORMA DEL RITME D'ACTIVITAT MOTORA ES DIFERENT SEGONS EL SEXE DE L'ANIMAL

Ha estat possible diferenciar entre els animals de cada sexe en base a l'espectre de potència. Aquest fet indica que els animals tenen una sèrie de components a nivell ultradiari que són diferents segons cada sexe. Aquesta diferenciació es produeix en estat adult, el que pot suggerir una modulació hormonal del ritme.

6.14. EL RITME D'ACTIVITAT MOTORA PERMET ESTABLIR DIFERENCIES ENTRE FAMILIES D'ANIMALS.

Alguns autors han trobat que el ritme d'activitat és diferent entre soques pures d'animals. En aquest treball ha estat possible classificar entre famílies d'una mateixa espècie de rates en base a l'espectre de potència del ritme d'activitat motora. Aquest fet confirma el caràcter hereditari del ritme.

6.15. LA VARIABILITAT ENTRE ELS PATRONS D'ACTIVITAT DELS INDIVIDUS S'INCREMENTA AMB LES GENERACIONS.

En cada generació la variabilitat entre els individus és més gran, el que pot indicar que el ritme d'activitat motora ve regit per més d'un gen. En la segona generació hi ha menys variabilitat encara que en



la primera, a causa d'un agrupament de caràcters en creuar-se els animals de la primera generació entre ells. En la tercera generació es manifesta una gran variabilitat que reflecteix la dispersió dels caràcters de les dues generacions anteriors.

6.16. ELS METODES D'AGREGACIO ASSAJATS HAN PERMES LA IDENTIFICACIO ENTRE ELS INDIVIDUS DE LES TRES GENERACIONS.

Tant utilitzant l'agregació jeràrquica com la gravitatòria es poden identificar tres nuclis corresponents a les tres famílies de les dues primeres generacions. Els elements de la tercera generació es troben dispersos en els tres nuclis principals el que indica que els individus presenten caràcters entre les tres famílies principals.

6.17. L'AGREGACIO GRAVITATORIA ES UN BON METODE GRAFIC PER A CLASSIFICAR ELS ANIMALS SEGONS LES SEVES PROXIMITATS QUAN A L'ESPECTRE.

L'agregació gravitatòria limitada és el mètode que ha donat millor resultat en classificar els animals, ja que de seguida ha classificat els animals segons les tres primeres famílies. Al mateix temps és el mètode que permet visualitzar d'una manera més clara i evident les agrupacions entre els animals.

6.18. ELS METODES DE CLASSIFICACIO SON UTILS PER A DIFERENCIAR ENTRE ANIMALS DE DIFERENTS GRUPS I PER A ESTABLIR DIFERENCIES INDIVIDUALS ENTRE ELS ANIMALS.

Els mètodes de classificació són útils per a diferenciar entre grups ben definits d'animals. En l'experiment han resultat útils per classificar entre

els animals dels dos sexes i per a establir diferències individuals entre els animals de cada família.

1. ABRAMOWITZ, M. i I.A. STEGUN. Handbook of mathematical function. Dover Publications, Inc. New York, 1965.
2. ALBERS, H.E. Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. *Am. J. Physiol.* 241:R62-R66, 1981.
3. ALBERS, H.E., GERALL, A.A. i J.F. AXELSON. Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiol. Behav.* 26:21-25, 1981.
4. ALBERS, H.E., LYDIC, R., GANDER, P.H. i M.C. MOORE-EDE. Role of the suprachiasmatic nuclei in the timing system of the squirrel monkey. I. The generation of rhythmicity. *Brain research* 300:275-284, 1984.
5. ALBERS, H.E., LYDIC, R. i M.C. MOORE-EDE. Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the squirrel monkey. II. Light-dark cycle entrainment. *Brain research* 300:285-293, 1984.
6. ALDIA, c. L'hibernation. *La recherche*, 12:1373-1383, 1981.
7. ANDREWS, R.V. i J.E. FOLK. Circadian metabolic patterns in cultured adrenal glands. *Comp. Biochem. Physiol.* 11:393-409, 1964.
8. ASCHOFF, J. Jahresperiodik der Fortpflanzung bei Warmblütern. *Stud. Gen.* 8:742-766, 1955.
9. ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:11-26, 1960.
10. ASCHOFF, J. Circadian system in man. *Science* 148:1427-1432, 1965.
11. ASCHOFF, J. Interdependent parameters of circadian activity rhythms in birds and man. *Dins de:*

- Biochronometry. M. Menaker, ed. Washington, DC. Natl. Acad. Sci, 1971, p3-29.
12. ASCHOFF, J. Circadian rhythms influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.*, 49:225-249, 1979.
  13. ASCHOFF, J., DAAN, S. I K.I. HONMA. Zeitgebers, entrainment and masking: some unsettled questions. *Dins de: Vertebrate circadian systems.* J. Aschoff, S. Daan, i G.A. Gross, eds. New York: Springer-Verlag, 1982, p 13-24.
  14. ASCHOFF, J., SAINT PAUL von, V. i R. WEVER. Die lebensdauer von Fliegen unter Einfluss von Zeitverschiebungen. *Naturwissenschaften*, 58:574,575, 1971.
  15. ASCHOFF, J. I R. WEVER. Spontanperiodik des Menschen bei ausschluss aller Zeitgeber. *Naturwissenschaften* 49:337-342, 1962.
  16. AXELROD, J., WURTMAN, R.J. i S.H. SNYDER. Control of hydroxyindole-o-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J. Biol. Chem.* 240:945-954, 1965.
  17. BANERJI, T.K., KACHI, T. i W.B. QUAY. Circadian changes in adrenal dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity dependency of change at darkness onset and the effect of pinealectomy on animal strain and age. *Chronobiologia* 6:1-7, 1978.
  18. BARNET. *Interpreting multivariate data.* Willey & sons eds., 1985.
  19. BINCLEY, S. Pineal rhythms in vivo and in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A:201-206., 1979.
  20. BINCLEY, S., RIEBMAN, J.B. i K. REILLY. Regulation of pineal rhythms in chickens: inhibition of dark-

- time N-acetyltransferase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 59C:165-171, 1978.
21. BINGHAM, C., ARBOGAST, B., CORNELISSEN, G., LEE, J. i F. HALBERG. Inferential methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9:397-439, 1982.
  22. BLISS, V. L. i F. H. HEPPNER. Circadian activity rhythm influenced by near zero magnetic field. *Nature*. 261:411-412, 1976.
  23. BLOCK, G. D. i T. L. PAGE. Circadian pacemakers in the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1:19-34, 1978.
  24. BORBELY, A. A. i H. V. NEUHAUS. Daily pattern of sleep, motor activity and feeding in the rat: Effect of regular and gradually extended photoperiods. *J. Comp. Physiol.* 124:1-14, 1978.
  25. BOULOS, Z., ROSSENWASSER, A. M. i M. TERMAN. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav. Brain Res.* 1:39-65, 1980.
  26. BOULOS, Z. i M. TERMAN. Splitting of circadian rhythms in the rat. *J. Comp. Physiol.* 134:75-83, 1979.
  27. BROWN, J. L. The evolution of behavior. W.W.Norton & Co: New York, 1975.
  28. BROWNSTEIN, M. J. i J. AXELROD. Pineal gland: 24-hour rhythms in norepinephrine turnover. *Science*, 184:163-165, 1974.
  29. BRUININK, A., LICHTENSTEIGER, W. i M. SCHLUMPF. Ontogeny of diurnal rhythms of central dopamine, serotonin and spirodecagona binding sites and of motor activity in the rat. *Life Sciences*, 33:31-38, 1983.

30. BÜNNING, E. Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblättern von *Phaseolus Multiflorus*. Jb. Wiss. Bot. 81:411-418, 1935.
31. BÜNNING, E. Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmik bei Insekten und Pflanzen. Berl. Dtsch. Bot. Ges. 53:594-623, 1935.
32. BÜTTNER, D. i F. WOLLNIK. Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat. Behav. Gen. 14:137-152, 1984.
33. CARD, J.P. i R.Y. MOORE. Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. J. Comp. Neurol. 206:390-396, 1982.
34. CARMICHAEL, M.S. i I. ZUCKER. Entrainment to non-24 hours days and gestation length of golden hamster. J. Reprod. Fert. 66:691-693, 1982.
35. CHATEFIELD, C. the analysis of time series, an introduction. Chapman & Hall, London-New York, 1984.
36. CASSONE, V.M., CHESWORTH, H.J. i S.M. ARMSTRONG. Entrainment of the rat circadian rhythm by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. Physiol. Behav. 36:1111-1121, 1986.
37. CREMER-BARTELS, G., KRAUSE, K., MITOSKAS, G. i D. BRODERSEN. Magnetic field of the earth as additional zeitgeber for endogenous rhythms?. Naturwissenschaften 71:567-574, 1984.a
38. CROWCROFT, P. i F.P. ROWE. Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (*Mus musculus*). Proc. Zool. Soc. Lond. 140:517-531,

- 1963.
39. CROSSLAND, W.J. i C.J. UCHWAT. Neurogenesis in the central visual pathways of the golden hamster. *Dev. Brain Res.* 5:99-103, 1982.
  40. CONNOLLY, M.S. i C.B. LYNCH. Classical genetic analysis of circadian body temperature rhythms in mice. *Behav. Gen.* 3:491-500, 1983.
  41. CUADRAS, C.M. Métodos de análisis multivariante. Editorial Universitaria de Barcelona, Barcelona, 1981.
  42. CZEISLER, C.A., ZIMMERMAN, J.C., RONDA, J., MOORE-EDDE, M.C. i E.D. WEITZMAN. Timing of REM sleep is coupled to the circadian rhythm of body temperature in man. *Sleep*, 2:329-346, 1980.
  43. DAAN, S. i J. ASCHOFF. Circadian contributions to survival. Dins de: *Vertebrate circadian systems*. J. Aschoff, S. Daan i G.A. Groos eds. Springer-Verlag. Berlin-New York, 1982.
  44. DAAN, S. i C.S. PITTENDRIGH. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 106:253-266, 1976.
  45. DAAN, S. i C.S. PITTENDRIGH. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant light: Homeostasis of frequency?. *J. Comp. Physiol.* 106:267-290, 1976.
  46. DAVIS, F.C., DARROW, J.M. i M. MENAKER. Sex differences in the circadian control of hamster wheel-running activity. *Am. J. Physiol.* 244:R93-R105, 1983.
  47. DAVIS, F.C. i R.A. GORSKI. Development of hamster circadian rhythms. I. Within-litter synchrony of mother and pup activity rhythms at weaning.

- Biology of reproduction 33:353-362, 1985.
48. DAVIS, F.C. i R.A.GORSKI. Development of hamster circadian rhythms: Prenatal entrainment of the pacemakers. *J. Biol. Rhythms* 1:77-89, 1985.
  49. DAVIS, F.C. i R.A.GORSKI. Unilateral lesions of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J. Comp. Physiol. A*, 154:221-232, 1984.
  50. DAVIS, F.C. i M.MENAKER. Development of the mouse circadian pacemaker independence from environmental cycles. *J. Comp. Physiol.* 143:527-539, 1981.
  51. DAVIS, F.C. i M.MENAKER. Hamsters through time's window: temporal structure of hamster locomotor rhythmicity. *Am. J. Physiol.* 239:R149-R155, 1980.
  52. DE COURSEY, P.J. Phase control of activity in a rodent. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:49-55, 1960.
  53. DE COURSEY, P.J. Daily light sensitivity rhythm in a rodent. *Science* 131:33-35, 1960.
  54. DEGUCHI, T. Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in the pineal gland of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2814, 1975.
  55. DEGUCHI, T. Circadian rhythms of enzyme and running activity under ultradian lighting schedule. *Am. J. Physiol.* 1:E375-E381, 1977.
  56. DEGUCHI, T. Circadian rhythms of indoleamines and serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal gland. *Molec. Cel. Biochem.* 27:57-66, 1979.



## Bibliografia

57. DEL POZO, F., DE FEUDIS, F.V. i J.M. JIMENEZ. Motilities of isolated and aggregated mice. A difference in ultradian rhythmicity. *Experientia* 34:1302-1304, 1978.
58. DIEZ NOGUERA, A. Estudi dels ritmes d'activitat motora del ratolí aïllat. Tesi doctoral. Facultat de Farmacia. Universitat de Barcelona. 1983.
59. DIEZ NOGUERA, A., CAMBRAS, T. i M. RIBOT. Sex differences in the motor activity pattern in mice. *IRCS Med. Sci.* 14:372, 1986.
60. DIEZ NOGUERA, A., CAMBRAS, T., RIBOT, M. i A. TORRALBA. Desarrollo del ritmo circadiano de actividad motora en el ratón. *Rev. Esp. Fisiol.* 40:275-280, 1985.
61. DIEZ NOGUERA, A., CASAMITJANA, N., GRIS, P., CAMBRAS, T. i M. RIBOT. Comparison of motor activity measured by two different methods: optical and inductive systems. *Rev. Esp. Fisiol.* 40:281-286, 1985.
62. EASTMAN, C.I., MISTLBERGER, R.E. i A. RECHTSCHAFFEN. Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol. Behav.* 32:357-368, 1984.
63. EASTMAN, C. i A. RECHTSCHAFFEN. Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. *Physiol. Behav.* 31:417-427, 1983.
64. EBIHARA, S. i H. KAWAMURA. The role of the pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the java sparrow, *Padda cryzivora*. *J. Comp. Physiol.* 141:207-214, 1981.
65. EBIHARA, S., TSUJI, K. i K. KONDO. Strain differences of the mouse's free-running circadian

- rhythm in continuous darkness. *Physiol. Behav.* 20:795-799, 1978.
66. ELLIOT, C. Circadian rhythm, entrainment and photoperiodism in the syrian hamster. *Dins de: Biological clocks in seasonal reproductive cycles.* B.K.Follet i D.E. Follet eds. Wright:Bristol, 1981, pp 203-217, 1981.
  67. ENRIGHT, J.T. The circadian tape recorder and its entrainment. *Dins de: Physiological adaptation to the environment.* J. Vernberg ed. Educational: New York, 1975, p 465-476.
  68. ENRIGHT, J.T. Temporal precision in circadian systems: a reliable neuronal clock from unreliable components?. *Science* 209:1542, 1980.
  69. FARNER, D.S. Annual rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 47:65-82, 1985.
  70. FEUERS, R.J., DELONGCHAMP, R.R., KRAMER, S., SCHEVING, L.E. i D.A. CASCIANO. The effect of age on the circadian rhythms of 23 liver or brain enzymes from C57BL/6J mice. *Gerontology* 31:46-53, 1985.
  71. FIELD, T., TING, G. i H.H. SHUMAN. The onset of rhythmic activities in normal and high-risk infants. *Develop. Psychobiol.* 12:97-100, 1979.
  72. FINGER, F.W. Relation of general activity in rats to environment temperature. *Percept. mot. skills*, 43,875-d890, 1976.
  73. FISKE, V.H. Effect of light on sexual maturation, estrous cycles and anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 29:187-196, 1941.
  74. FOLKARD, S. i T.H. MONK. Circadian rhythm in human memory, *Brit. J. Psychol.*, 71:295-307, 1980.

## Bibliografia

75. FUCHS, J.L. i R.Y. MOORE. Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: A study using the 2-deoxy(1-14C)glucose method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1204-1208, 1980.
76. FULLER, C.A., LYDIC, R., SULTZMAN, F.M., ALBERS, H.E., TEPPER, B. i M.C. MOORE-EDE. Circadian rhythm of body temperature persists after suprachiasmatic lesions in the squirrel monkey. Am. J. Physiol., 241:R385-R391, 1981.
77. FULLER, C.A. i F.M. SULTZMAN. Circadian control of body temperature in primates. Dins de Vertebrate circadian system. J. Aschoff, S. Daan i G.a. Groos eds. Springer verlag: New York, Berlin, 1982.
78. FULLER, C.A., SULTZMAN, F.M. i M.C. MOORE-EDE. Circadian control of thermoregulation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). Am. J. Physiol. 236:R153-R161, 1979.
79. GANDER, P.H. i M.C. MOORE-EDE. Light-dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. Am. J. Physiol. 245:R927-R934, 1983.
80. GARDNER, G.F. i J.F. FELDMAN. The *frq* locus in *Neurospora crassa*: a key element in circadian clock organization. Genetics 96:877-886, 1980.
81. GARFINKEL, A. A mathematics for physiology. Am. J. Physiol., 245:R455-R466, 1983.
82. GIBBS, F.P. Temperature dependence of the hamster circadian pacemaker. Am. J. Physiol. 244:R607-R610, 1983.
83. GOLDBETER, A. i D. DECROLY. Temporal self-organization in biochemical systems: Periodic behavior vs chaos. Am. J. Physiol., 245:R248-R483, 1983.

## Bibliografía

84. GOLDMAN, B.D. i J.M. DARROW. The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* 37:386-396, 1983.
85. GROSS, G.A. The neurophysiology of the mammalian suprachiasmatic nucleus and its visual afferences. *Dins de: vertebrate circadian systems.* Springer-Verlag. New York, 1982.
86. GUILLERY, R.W. Visual pathways in albinos. *Scient. Am.* 230:44-54, 1974.
87. GUISSADO, E., FERNANDEZ-TOME, P., GARZON, J. i J. DEL RIO. Increased dopamine receptor binding in the striatum of rats after long-term isolation. *Eur. J. Pharmacol.* 65:463-464, 1980.
88. GULDNER, F.H. Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 165:509-544, 1976.
89. GUTTMAN, I. *Linear models, an introduction.* John Wiley & sons Inc., 1982.
90. GWINNER, E. Testosterone induces "splitting" of circadian locomotor activity in birds. *Science* 185:72-74, 1974.
91. GWINNER, E. Effects of pinealectomy on circadian locomotor activity rhythms in european starlings, *Sturnus vulgaris.* *J. Comp. Physiol.* 126:123-129, 1978.
92. GWINNER, E. Ritmos internos en la migración de las aves. *Scient. Am.* 117:48-56, 1986.
93. HALBERG, F. Temporal coordination of physiologic functions. *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 25:289-310, 1960.

94. HALBERG, F., CARADENTE, F., CORNELISSEN, G. i G.S. KATINAS. Glossary of chronobiology. *Chronobiologia*, 4(suppl.1):1-189, 1979
95. HALBERG, F., WISSCHER, M.B. i J.J. BITTNER. Relation of visual factors to eosinophil rhythms in mice. *Am. J. Physiol.* 179:229-235, 1954.
96. HARDELAND, R. Circadian rhythmicity in cultured liver cells. I. Rhythms in tyrosine aminotransferase activity and inducibility and in (3H)leucine incorporation. *Int. J. Biochem.* 4:581-590, 1973.
97. HARDELAND, R. Circadian rhythmicity in cultured liver cells. II. reinduction of rhythmicity in tyrosine aminotransferase activity. *Int. J. Biochem.* 4:591-595, 1973.
98. HERY, M.E., LAFLANTE, E. i C. KORDON. Participation of serotonin in the phasic release of LH. II Effects of lesions of serotonin containing pathways in the CNS. *Endocrinology*, 102:1019-1025, 1978.
99. HIROSHIGE, T., ABE, K., WADA, S. i M. KANEKO. Sex differences in circadian periodicity of CRF activity in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 11:306-320, 1973.
100. HOEL, P.G. Introducción a la estadística matemática. Ed. Ariel, Barcelona, 1976.
101. HOFFMAN, J.C. The influence of photoperiods on reproductive functions in female mammals. *Dins de: Handbook of physiology*, vol. II. R.D. Greep ed. Am. Physiol. Soc. Washington D.C., 1973.
102. HONMA, K. i T. HIROSHIGE. Internal synchronization among several rhythms in rats under constant light. *Am. Physiol.* 4:R243-R249, 1978.
103. HONMA, K. i T. HIROSHIGE. Simultaneous

- determination of circadian rhythms of locomotor activity and body temperature in the rat. *Jap. J. Physiol.* 28:159-169, 1978.
104. HONMA, S., HONMA, K., SHIRAKAWA, T. i T. HIROSHIGE. Effects of elimination of maternal circadian rhythms during pregnancy on the postnatal development of circadian corticosterone rhythm in blinded infantile rats. *Endocrinology* 114:44, 1984.
105. HONMA, S., HONMA, K., SHIRAKAWA, T. i T. HIROSHIGE. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 114:1791-1796, 1984.
106. HOPPENBROUWERS, T., JENSEN, D., HODGMAN, J., HARPER, R. i M. STERMAN. Respiration during the first six months of life in normal infants. II. The emergence of a circadian system. *Neuropädiatrie*, 10:264-280, 1979.
107. HRUSHESKY, W. J. The clinical application of chronobiology to oncology. *Am. J. Anat.* 168:519-542, 1983.
108. ILLNEROVA, H. i J. VANECEK. Two-oscillator structure of the pacemaker controlling the circadian rhythm of N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J. Comp. Physiol.* 145:539-548, 1982.
109. INGRAM, D. K., LONDON, E. D. i M. A. REYNOLDS. Circadian rhythmicity and sleep: Effects of aging in laboratory animals. *Neurobiol. aging*. 3:287-297, 1982.
110. INOUE, S. Light-dependent and light-independent estrous cycles and locomotor activity rhythms in rats regulating their cage illumination. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 12:141-160, 1981.
111. INOUE, S. T. Does the ventromedial hypothalamic

- nucleus contain a self-sustained circadian oscillator associated with periodic feedings?. *Brain Res.* 279:53-63, 1983.
112. INOUE, S.T. i H. KAWAMURA. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5962, 1979.
113. ISAKSSON, A., KALLNER, A., LANTTO, O. i C. SOMELL. Rhythmic changes in estriol excretion during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137:470-479, 1980.
114. JACKLET, J.W. Neurobiology of circadian rhythms generators. *Trends Neurosci.* 8:69-73, 1985.
115. JOHNSON, M.S. Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (*peromyscus*). *J. Exp. Zool.* 82:315-318, 1939.
116. JOHNSON, A., PFLUG, B., ENGELMANN, W. i W. KLEMKE. Effect of lithium carbonate on circadian periodicity in humans. *Pharmacopsychiatria* 12:423-425, 1979.
117. KAFKA, M.S., MARANGOS, P.J. i R.Y. MOORE. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptor. *Brain Res.* 327:344-347, 1985.
118. KAFKA, M.S., WIRZ-JUSTICE, A., NABER, D., MOORE, R.Y. i M.A. BENEDITO. Circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Fed. Proc.* 42:2796-2801, 1983.
119. KAFKA, M.S., WIRZ-JUSTICE, A., NABER, D. i T.A. WEHR. Circadian acetylcholine receptor rhythm in rat brain and its modification by imipramine. *Neuropharmacology* 20:421-425, 1981.
120. KANNO, Y. Experimental studies on body temperature

- rhythm in dogs. II. Development of circadian rhythm after birth. *Jap. J. Vet. Sci.* 40:591-602, 1978.
121. KASAL, C.A., MENAKER, M. i J.R. PEREZ-POLO. Circadian clock in culture: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates in vitro. *Science*, 203:656-658, 1979.
122. KAVALIERS, M. The pineal organ and circadian organization of teleost fish. *Rev. Can. Biol.* 38:281-292, 1979.
123. KAVALLIERS, M. Period lengthening and disruption of socially facilitated circadian activity rhythms of Goldfish by lithium. *Physiol. Behav.* 27:625-628, 1981.
124. KENAGY, G.J. Seasonality of endogenous circadian rhythms in a diurnal rodent *Peromyscus leucurus* and a nocturnal rodent *Dipodomys merriami*. *J. Comp. Physiol.* 128:21-36, 1978.
125. KENDALL, M. Time series. Charles Griffin & Co. Ltd. London-High Wycombe, 1984.
126. KLEIBER, M. The fire of life. John Wiley & sons, New York, 1961.
127. KLEIN, D.C. i R.Y. MOORE. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174:245-262, 1979.
128. KLEIN, D.C. i J. WELLER. Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093-1095, 1970.
129. KLEITMAN, N. i T.G. ENGELMAN. Sleep characteristics of infants. *J. Appl. Physiol.* 6:269-282, 1953.



## Bibliografía

130. KONOPKA, R.J. i S. BENZER. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68:2112-2116, 1971.
131. KONOPKA, R.J. i S. WELLS. *Drosophilla* clock mutations affect the morphology of a brain neurosecretory cell group. J. Neurobiol. 11:411-415, 1980.
132. KRASNOFF, A. i L.M. WESTON. Puberal status and sex differences: activity and maze behavior in rats. Develop. Psychobiol. 9:261-269, 1976.
133. KRIEGER, D.T. Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. Science, 197:398-399, 1980.
134. KRIPKE, D.F., MULLANEY, D.J., ATKINSON, M. i S. WOLF. Circadian rhythm disorders in manic-depressives. Biol. Psychiat. 13:335-351, 1978.
135. KRIPKE, D.F. i V.G. WYBORNEY. Lithium slows rat circadian activity rhythms. Life Sci. 26:1319-1321, 1980.
136. LAMBERT, H.M. Continuous red light induces persistent estrous without retinal degeneration in the albino rat. Endocrinology, 97:208-210, 1975.
137. LANGNER, R. i L. RENSING. Circadian rhythms of oxygen consumption in rat liver suspension culture: changes of pattern. Z. Naturforsch 27:1117-1118, 1972.
138. LASALLE, J.M. i G. LEPAPE. Locomotor activity of two inbred strains of mice in a seminatural and a breeding cage environment. Behav. Gen. 8:371-376, 1978.
139. LEBART, L., MORINEAU, A. i J.P. FENELON. Tratamiento estadístico de datos. Marcombo-Boixareu Eds.

## Bibliografia

Barcelona-Mexico, 1985.

140. LENN.N.J., BEEBE,B. i R.Y. MOORE. Postnatal development of the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.*,178:463-475, 1977.
141. LEVINE.M.S., HULL,C.D. i N.A.BUCHWALD. Development of motor activity in kittens. *Develop. Psychobiol.* 13:357-371, 1980.
142. LEWY,A.J., WHER,T.A., GOODWIN,F.K., NEWSOME,D.A. i S.P. HARKEY. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 210:1267-1268, 1980.
143. McCLINTOCK,M.K. Sociology of reproduction in the norway rat (*Rattus norvegicus*) estrous synchrony and the role of the female rat in copulatory behavior. PH.D. Thesis. Univ. Pennsylvania, 1974.
144. McGULLAGH,P. i J.A. NELDER. Generalized linear models. Chapman and Hall, London-New York, 1983.
145. MENAKER,M. Endogenous rhythms of body temperature in hibernating bats. *Nature* 184:1251-1252, 1959.
146. MILLARD,W.J., REPERT,S.M., SAGAR,S.M. i J.B. MARTIN. Light-dark entrainment of the growth hormone ultradian rhythm in the rat is mediated by the arcuate nucleus. *Endocrinology*, 108:2394, 1981.
147. MITLER,M.M., LUND,R., SOKOLOVE,P.G., PITTENDRIGH, G.S. i W.C. DEMENT. Sleep and activity rhythms in mice: A description of circadian patterns and unexpected disruptions in sleep. *Brain Res.* 131:129-145, 1977.
148. MIYABO,S., YANAGISAWA,K., DOYA,E., HISADA,T. i S. KISHIDA. Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in female rats: effect of periodic maternal deprivation and food restriction. *Endocrinology* 106:636, 1980.

## Bibliografia

149. MOORE, R.Y. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42:2783-2789, 1983.
150. MOORE, R.Y. The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends in Neurosci.* 5:404-407, 1982.
151. MOORE, R.Y. i V.B. EICHLER. Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201-206, 1972.
152. MOORE, R.Y. i N.J. LENN. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146:1-14, 1972.
153. MOORE, R.Y. i M.E. TRAYNOR. Diurnal rhythms in pineal N-acetyltransferase and hippocampal norepinephrine : effects of water deprivation, blinding and hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 20:250-259, 1976.
154. MOORE-EDE, M.C., SULZMAN, F.M. i C.A. FULLER. The clocks that time us. *Physiology of the circadian timing system.* Harvard Univ. Press. Cambridge, 1982.
155. MOORE-EDE, M.C. i G.S. RICHARDSON. Medical implications of shift-work. *Ann Rev. Med.* 36:607-617, 1985.
156. MOORE-EDE, M.C. The circadian timing system in mammals: two pacemakers preside over many secondary oscillators. *Fed. Proc.* 42:2802-2808, 1983.
157. MOORE-EDE, M.C. Physiology of the circadian timing system: Predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.*, 250:R735-R752, 1986.

## Bibliografia

158. MORIN, L.P. Effect of ovaraium hormones on synchrony of hamsters circadian rhythms. *Physiol. Behav.* 24:741-749, 1980.
159. MORIN, L.P., FITZGERALD, K.M., RUSAK, B. i I. ZUCKER. Circadian organization and neural mediation of hamster reproductive rhythms. *Psychoneuroendocrinology* 2:73\_98, 1977.
160. MOSKO, S.S., ERICKSON, G.F. I R.Y. MOORE. Dampened circadian rhythms in reproductively senescent rats. *Behav. Neural. Biol.* 28:1-14, 1980.
161. MOSKO, S.S. i R.Y. MOORE. Neonatal ablation of the suprachiasmatic nucleus: effects on the development of the pituitary-gonadal axis in the female rat. *Neuroendocrinology* 29:350-361, 1979.
162. NASH, J.C. Compact numerical methods for computers: Linear algebra and function minimization. Adam Hilger, Ltd., Bristol, 1979.
163. NELSON, W., NICHOLS, G., HALBERG, F. i G. KATTKE. Interacting effects of lighting (LD12:12) and restricted feeding (4H/24H) on circadian temperature rhythm of mice. *Int. J. Chronobiol.* 1:347, 1973.
164. NEUMANN, D. Adaptations of chironomids to intertidal environments. *Ann. Rev. Entomol.* 21:387-414, 1976.
165. NOELL, W.K., WALKER, V.S., KANG, B.S. i S. BERMAN. Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* 5:450-473, 1966.
166. NORMAN, R.L. i H.G. SPIES. Neural control of the estrogen-dependent twenty-four hours periodicity of LH release in the golden hamster. *Endocrinology* 95:1367-1372, 1974.
167. OGLE, J.W. On the diurnal variations in the

- temperature of the human body in health. St. George's Hosp. Rep. 1:220-245, 1866.
168. OOMURA, Y., ONO, T., NISHINO, H., KITA, H., SHIMIZU, N.,  
ISHIZUKA, S. i K. SASAKI. Hypothalamic control of  
feeding behavior: modulation by the suprachiasmatic  
nucleus. Dins de Biological rhythms and their  
central mechanisms (M. Suda, O. Hayaishi i H.  
Nakagawa, eds.). New York: Elsevier North Holland,  
295-308, 1979.
169. ORR, W.C. Biological rhythms in behavioral  
medicine. Biol. Psychol. Bull. 5:62-69, 1977.
170. ORR, W.C., HOFFMAN, H.J. i F.W. HEGGE. The  
assessment of time-dependence changes in human  
performance. Chronobiologia 3:293-305, 1976.
171. OXENKRUG, G.F., McINTYRE, I.M. i S. GERSMON. Effects  
of pinelectomy and aging on the serum  
corticosterone circadian rhythms in rats. J.  
Pineal Res. 1:181-185, 1984.
172. PFEFFER, W. Physiologische Untersuchungen. Wilhem  
Engelmann. Leipzig. 1873.
173. PICKARD, G.E., KAHN, R. i R. SILVER. Splitting of  
the circadian rhythm of body temperature in the  
golden hamster. Physiol. Behav. 32:763-766, 1984.
174. PICKARD, G.E. i F.W. TUREK. Splitting of the  
circadian rhythm of activity is abolished by  
unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei.  
Science 215:1119-1121, 1982.
175. PICKARD, G.E. i F.W. TUREK. The suprachiasmatic  
nuclei: two circadian clocks ?. Brain Res.  
268:201-210, 1983.
176. PICKARD, G.E. i F.W. TUREK. The hypothalamic  
paraventricular nucleus mediates the photoperiodic  
control of reproduction but not the effects of

- light on the circadian rhythm of activity. *Neurosci. lett.* 43:67-72, 1983.
177. PITTENDRIGH, C.S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:155-184, 1960.
178. PITTENDRIGH, C.S. Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular system. *Dins de The neurosciences third study program.* F.O. Smith i F.G. Worden eds. Cambridge, Mass. MIT Press, 1974, pp 437-458.
179. PITTENDRIGH, C.S. i P.C. CALDAROLA. General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2697-2701, 1973.
180. PITTENDRIGH, C.S. i S. DAAN. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol* 106:223-252, 1976.
181. PITTENDRIGH, C.S. i S. DAAN. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as a clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291-331, 1976.
182. POHL, H. Strain differences in responses of the circadian system to light in the syrian hamster. *Experientia* 39:372-374, 1983.
183. POLAND, R.E., WEICHSEL, M.E. i R.T. RUBIN. Neonatal dexametasone administration. I. temporary delay of development of the circadian serum corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 108:1049-1054, 1981
184. POLAND, R.E., WEICHSEL, M.E. i R.T. RUBIN. Neonatal dexametasone administration. II. temporary delay of development of the circadian serum corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 108:1055-1059, 1981.

185. PORGES, S.W. i R.E. BOMRER. New time-series statistic for detecting rhythmic cooccurrence in the frequency domain: the weighted coherence and its application to psychophysiological research. *Psychol. Bull.* 88:580-587, 1980.
186. POSSIDENTE, B. Pigment mutations associated with alterned circadian rhythms in mice. *Physiol. Behav.* 28:389-392, 1982.
187. POSSIDENTE, B. i J.P. HEGMANN. Circadian complexes: circadian rhythms under common gene control. *J. Comp. Physiol.* 139:121-125, 1980.
188. POSSIDENTE, B. i J.P. HEGMANN. Gene differences modify Aschoff's rule in mice. *Physiol. Behav.* 28:199-200, 1982.
189. POSSIDENTE, B., HEGMANN, J.P., ELDER, B. i L. CARLSON. Dissociation of circadian rhythms for food and water consumption in mice. *Physiol. Behav.* 25:279-281, 1980.
- 189a QUAY, W.B. Precocious entrainment and associated characteristics of activity patterns following pinealectomy and reversal photoperiod. *Physiol. Behav.* 5:1281-1290, 1970.
190. RAMALEY, J.A. The development of daily changes in serum corticosterone in pre-weaning rats. *Steroids* 21:433, 1973.
191. REGAL, P.J. i M.S. CONNOLLY. Social influences on biological rhythms. *Behaviour* 72:172-199, 1980.
192. REINBERG, A., ANDLAUER, P., PRINS de, J., HALBERG, W., VIEUX, N. i P. BOURDELEAU. Desynchronization of the oral temperature circadian rhythm and intolerance to shift-work. *Nature* 308:272-274, 1984.

193. REINBERG, A., ANDLAUER, P., GUILLET, P., NICHOLAI, A., VIEUX, N. i A. LAPDRE. Oral temperature, circadian rhythm amplitude aging and tolerance to shift-work. *Ergonomics* 23:55-64, 1980.
194. REINBERG, A. i M.H. SMOLENSKY. Introduction to chronobiology. Dins de: *Biological rhythms and medicine*. Springer-Verlag. New York. 1983.
195. REINBERG, A. i M.H. SMOLENSKY. Investigative methodology for chronobiology. Dins de: *Biological rhythms and medicine*. Springer-Verlag. New York, 1983.
196. REITER, R.J., RICHARDSON, B.A., JOHNSON, L.Y., FERGUSON, B.N. i D.T. DINH. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging syrian hamsters. *Science* 210:1372-1373, 1980.
197. REPERT, S.M., CHEZ, R.A., ANDERSON, A. i D.C. KLEIN. Maternal fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr. Res.* 13:788-791, 1979.
198. REPERT, S.M., COLEMAN, R.J., HEATH, H.W. i J.R. SWEDLOW. Pineal N-acetyltransferase activity in 10-days old rats: a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinology* 115:918-925, 1984.
199. REPERT, S.M. i W.J. SCHWARTS. Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 27:969-971, 1983.
200. REPERT, S.M. i W.J. SCHWARTZ. The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: Characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *J. Neurosci* 4:1677-1682, 1984.
201. RIBAK, C.E. i A. PETERS. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res.* 92:341-368, 1975.



202. RICHTER, C.P. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psych. Monographs*. 1:1-55, 1922.
203. RICHTER, C.P. Animal behavior and internal drives. *Q.Rev. Biol.* 2:307-342, 1927.
204. RICHTER, C.P. Sleep and activity: Their relation to the 24-hours clock. *Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 45:8-27, 1967.
205. RICHTER, C.P. Inherent twenty-four hour and lunar clocks of a primate, the squirrel monkey. *Comm. Behav. Biol.* 1:305-332, 1968.
206. ROCKWELL, D.A., WINGET, C.M., ROSENBLATT, L.S., HIGGINS, E.A. i N.W. HETHERINGTON. Biological aspects of suicide. Circadian disorganization. *J. Nerv. Ment. Dis.* 166:855-858, 1978.
207. ROLLAG, M.D. i M.H. STETSON. Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in golden hamster. *Biology of reproduction* 24:311-314, 1981.
208. RUSAK, B. The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of circadian rhythms in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Comp. Physiol.* 118:145-164, 1977.
209. RUSAK, B. Involvement of the primary optic tracts in mediation of light effects on hamster circadian rhythms. *J. Comp. Physiol.* 118:165-172, 1977.
210. RUSAK, B. Neural mechanisms for entrainment and generation of mammalian circadian rhythms. *Fed. Proc.* 38:2589-2595, 1979.
211. RUSAK, B. Physiological models of the rodent circadian system. *Dins de: Vertebrate circadian systems*. J. Aschoff, S. Daan, G.A. Groos eds. Springer-Verlag. New York, 1982.
212. RUSAK, B. i I. ZUCKER. Neural regulation of

- circadian rhythm. *Physiol. Rev.* 59:440-526, 1979.
213. SAAVEDRA, J.M., PALKOVITS, M., BROWN-STEIN, M.J. i J. AXELROD. Serotonin distribution in the nuclei of the rat hypothalamus and preoptic region. *Brain Res.* 77:157-165, 1974.
214. SACHER, G.A. i P.H. DUFFY. Age changes in rhythms of energy metabolism activity and body temperature in *Mus* and *Peromyscus*. *Dins de: Aging and Biological rhythms.* H.V. Samis i S. Capobiano eds. Plenum Press. New York. 1978.
215. SACHS, J., UNGAR, J., WASER, P.G. i A.A. BORBELY. Factors in cerebrospinal fluid affecting motor activity in the rat. *Neurosci. Lett.* 2:83-96, 1976.
216. SAHAKIAN, B.J., BURDESS, C., LUCKHURST, H. i P. TRAYHURN. Hyperactivity and obesity: The interaction of social isolation and cafeteria feeding. *Physiol. Behav.* 28:117-124, 1984.
217. SASAKI, Y., MURAKAMI, N. i K. TAKAHASHI. Critical period for the entrainment of the circadian rhythm in blinded pups by dams. *Physiol. Behav.* 33:105-109, 1984.
218. SCHWARTZ, W.J. i M. GAINER. Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>12</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197:1089-1091, 1977.
219. SCHWARTZ, W.J., DAVIDSON, L.C. i C.B. SMITH. In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 189:157-167, 1980.
220. SEBER. *Multivariate observations.* Willey & sons, 1985.
221. SHARMA, K.N., ANAND, B.K., DUA, S. i B. SINGH. Role of stomach in regulation of activities of hypothalamic

- feeding centers. *Am. J. Physiol.*, 201:593-598, 1961.
222. SHIBATA, S., LIU, S.Y. i S. UEKI. Development of the circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus of rat hypothalamic slices. *Neurosci. Lett.* 43:231-234, 1983.
223. SIEGEL, S. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas, México, 1978.
224. SIFFRE, M. Beyond time. H. Briffauklit ed. Mc Graw-Hill. New York. 1964.
225. SIMPKINS, J.W., KALRA, P.S. i S.P. KALRA. Alterations in daily rhythms of testosterone and progesterone in old male rats. *Exp. Aging Res.* 7:25-31, 1981.
226. SIMPSON, S. i J.J. GALBRAITH. Observations on the normal temperature of the monkey and its diurnal variation and on the effect of changes in the daily routine on this variation. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh* 45:65-106, 1906.
227. SMITH, P.H. Genetic manipulation of the circadian clock's timing of sexual behavior in the queensland fruit flies, *Dacus tryoni* and *Dacus neohumeralis*. *Physiol. Entomol.* 4:71-78, 1979.
228. SMITH, G.K. i V. ANDERSON. Effects of maternal isolation on the development of activity rhythms in infant rats. *Physiol. Behav.* 33:751-756, 1984.
229. SHIMIZU, K. i m. MOKANO. Intraocular 6-hydroxydopamine prevents the persistent estrous induced by continuous light. *Experientia* 41:125-127, 1985.
230. SOKOLOVE, P.G. i W.N. BUSHELL. The Chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72:131-160, 1978.

231. SOFRONIEW, M.V. i A. WEINDL. Neuroanatomical organization and connection of the suprachiasmatic nucleus. Dins de Vertebrate circadian system. J. Aschoff, S. Daan i G.A. Groos. New York, Berlin: Springer Verlag, 1982.
232. STEPHAN, F.K. i A.A. NUNEZ. Elimination of circadian rhythms in drinking, activity, sleep and temperataure by isolation of the suprachiasmatic nuclei. *Behav. Biol.* 20:1-16, 1977.
233. STEWART, M.C. i W.C. REEDER. Temperature and light synchronization experiments with circadian activity rhythms in two color forms of the rock pocke mouse. *Physiol. Zool.* 41:149-156
234. STRUMWASSER, F. i D.P. VIELE. Lithium increases the period of a neuronal circadian oscillator. *Soc. Neurosci. Abstr.* 6:707, 1980.
235. SULZMAN, F.M., FULLER, C.A. i M.C. MOORE-EDE. Environmental synchronization of squirrel monkey circadian rhythms. *J. Appl. Physiol.* 43:795-800, 1977.
236. SULZMAN, F.M., FULLER, C.A. i M.C. MOORE-EDE. Comparison of synchronization of primate circadian rhythms by light and food. *Am. J. Physiol.* 234:R130-R135, 1978.
237. SULZMAN, F.M., FULLER, C.A. i M.C. MOORE-EDE. Tonic effects of light on the circadian systems of the squirrel monkey. *J. Comp. Physiol.* 129:43-50, 1979.
238. SULZMAN, F.M., FULLER, C.A. i M.C. MOORE-EDE. Feeding time synchronizes primate circadian rhythms. *Physiol. Behav.* 18:775-779, 1977.
239. SUMMER, T.L., FERRARO, J.S. i C.E. McCORMACK. Phase-response and Aschoff illuminance curves for locomotor activity rhythm of the rat. *Am. J.*

- Physiol. 246:R299-R304, 1984.
240. SZAFARCZYK, A., ALONSO, G., IXART, G., MALAVAL, F., NOUGUIER-SOULE, J. i I. ASSENMACHER. The serotonergic system and the circadian rhythms in ACTH and corticosterone in rats. *Am. J. Physiol.*, 239:482-489, 1980.
241. TABACHNICK, B.G. i L.S. FIDELL. Using multivariate statistics. Harper & Row Publishers, New York, 1983.
242. TAKAHASHI, K. i T. DEGUCHI. Entrainment of the circadian rhythms of blinded infant rats by nursing mothers. *Physiol. Behav.* 31:373-378, 1983.
243. TAKAHASHI, K., HANADA, K. i Y. TAKAHASHI. Factors setting the phase of the circadian adrenocortical rhythm in rats. *Dins de: biological rhythms and their central mechanisms.* M. Suda, O. Hayaishi i H. Nakagawa eds. Elsevier, New York. p 189-198. 1979.
244. TAKAHASHI, J.S. i MENAKER. Physiology of avian circadian pacemakers. *Federation Proc.* 38:2583-2588, 1979.
245. TAKAHASHI, K., HANADA, K., KOBAYASHI, K., HAYAFUJI, C. OTANI, S. i Y. TAKAHASHI. Development of the circadian adrenocortical rhythm in rats: studied by determination of 24 or 48 hour pattern of blood corticosterone levels in individual pups. *Endocrinology* 104:954-961, 1979.
246. TAKAHASHI, K., INOUE, K., KOBAYASHI, K., HAYAFUJI, C. NAKAMURA, Y. i Y. TAKAHASHI. Mutual influence of rats having different circadian rhythm of adrenocortical activity. *Am. J. Physiol.* 3:E515-E520, 1978.
247. TAKAHASHI, K., MURAKAMI, N., HAYAFUJI, C. i Y. SASAKI. Further evidence that circadian rhythm of blinded rat pups is entrained by the nursing dam.

- Am. J. Physiol. 246:R359-R363, 1984.
248. TAHAHASHI, M. i Y. SUZUKI. The dependency of the rat estrous cycle on the daily alternation of light and dark. *Endocrinol. Japan*, 16:87-102,
249. TAMARKIN, L., HUTCHISON, J.S. i B.B. GOLDMAN. Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the syrian hamster. *Endocrinology* 99:1528-1583, 1976.
250. TER HARR, M.B., MCKINNON, C.B. i M.G. BULMER. Sexual differentiation in the phase of the circadian rhythm of (35S)methionine incorporation into cerebral proteins and of serum gonadotrophin levels. *J. Endocrinol.* 62:257-265, 1975.
251. TERMAN, J.S. i M. TERMAN. Effects of illumination level on the rat's rhythmicity of brain self-stimulation behaviour. *Behav. Brain Res.* 1:507-519, 1980.
252. THEXTON, A.J., GRIFFITHS, C. i J. MCGARRICK. Evidence for peripheral activation of the trigeminal rhythms generator in the decerebrate rat, obtained by Fourier analysis of conditioning testing curves. *Arch. Oral Biol.* 25:491-494, 1980.
253. TSAI, T.H., SCHEVING, L.E., SCHEVING, L.A. i J.E. PAULY. Sex differences in circadian rhythms of several variables in limboreticular organs, liver, kidney and corneal epithelium in adult CD2F mice. *The anatomical record*, 211:263-275, 1985.
254. TUREK, F.W. i C.C. CAMPBELL. Photoperiod regulation of neuroendocrine gonadal activity. *Biol. Reprod.* 20:32-50, 1979.
- 254a UNDERWOOD, H. Circadian organization in fish, reptiles and amphibians: Role of the pineal gland. *Diss. de: The pinal gland. vol III. Extra-reproductive effects.* R.J. Reiter ed. CRM Press,

Boca Raton, Florida, 1982.

255. UPDIKE, P.A., ARCCURSO, F.J. i R.H. JONES. Physiologic circadian rhythmicity in preterm infants. *Nurs. Res.* 34:160-163, 1985.
256. VAN DER POL, A.N. i T. FOWLEY. A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. *Brain Res.* 160:307-326, 1979.
257. VAN DER TOUW, J., THROWER, S.J. i J. OLLEY. Non-specific neural stimuli and metabolic rhythms in rats. *Physiol. Bohemoslovaca* 27:501-504, 1978.
258. VAUGHAN, M.K., RICHARDSON, B.A., CRAFT, C.M., POWANDA M.C. i R.J. REITER. Interaction of aging, photoperiod and melatonin on plasma thyroid hormones and cholesterol levels in female syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Gerontology* 28:345-353, 1982.
259. WALSH, S.W., DUCSAY, C.A. I M.J. NOVY. Circadian hormonal interactions among the mother, fetus and amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150:745-753, 1984.
260. WAX, T.M. Effects of age, strain, and illumination intensity on activity and self-selection of light-dark schedules in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91:51-62, 1977.
261. WEBER, A.L. The free-run period is not the best zeitgeber period for the house mouse. *Physiol. Behav.* 23:1165-1169, 1979.
262. WEHR, T.A., LEWY, A.J., WIRZ-JUSTICE, A., CRAIG, C. i C. TAMARKIN. Antidepressants and a circadian rhythm phase-advance hypothesis of depression. *Dins de: Brain peptides and hormones.* R. Collu ed. Raven Press, New York, 1982.

263. WEITZMAN, E.D., MOLINE, M.L., CZEISLER, C.A. I J.C. ZIMMERMAN. Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurol. Aging* 3:299-309, 1982.
264. WEVER, R. Internal phase angle differences in human circadian rhythms: causes for changes and problems of determinations. *Int. J. Chronobiol.* 1:371-390, 1973.
265. WEVER, R.A. Fractional desynchronization of human circadian rhythms. A method for evaluating entrainment limits and functional interdependencies. *Pflügers Arch.* 396:128-137, 1983.
266. WEVER, R.A. The circadian system of man. Springer-Verlag. New York, 1979.
267. WEVER, R.A. Internal interactions within the human circadian system: the masking effect. *Experientia* 41:332-342, 1985.
268. WILLIAMS, T.P. i B.N. BAKER. The effects of constant light on visual processes. Plenum Press. New York, 1980.
269. WILLIAMS, E.A. i J.M. GOTTMAN. Time series analysis. Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
270. WILSON, E.O. Sociobiology: the new synthesis. Harvard Univ. Press. Cambridge, 1975.
271. WINFREE, A.T. Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. Theoret. Biol.* 16:15-42, 1967.
272. WIRTH-JUSTICE, A., GROOS, G.A. i T.A. WEHR. The neuropharmacology of circadian timekeeping in mammals. *Dins de Vertebrate Circadian System.* J.



- Aschoff, S. Daan i G.A. Groos. New York, Berlin, Springer Verlag, 1982, pp 183-193.
273. WIRZ-JUSTICE, A., KAFKA, M.S., NABER, D., CAMPBELL, I.C., MARANGOS, P.J. TAMARKIN, L. i T.A. WEHR. Clorgiline delays the phase position of circadian neurotransmitter receptor rhythms. *Brain Res.* 241:115-122, 1982.
274. WIRZ-JUSTICE, A. i T.A. WEHR. Uncoupling of circadian rhythms in hamsters and man. *Dins de: Sleep.* W.P. Koella ed. Karger. Basel. 1980.
275. WOLLNIK, F. Sex differences in the daily pattern of locomotor activity in laboratory rats. *Naturwissenschaften* 72:5-158, 1985.
276. WOLLNIK, F. i K.D. DOHLER. Effect of adult or perinatal hormonal environment on ultradian rhythms in locomotor activity of laboratory LEW/ZTM rats. *Physiol. Behav.*, 38:229-240, 1986.
277. WOLLRATH, L., KANTARJAN, A. i C. HOWE. Mammalian pineal gland: 7-day rhythmic activity?. *Experientia*, 31:458-460.
278. YU, H.S., PANG, S.F., TANG, P.L. i G.H. BROWN. Persistence of circadian rhythms of melatonin and N-acetylserotonin in the serum of rats after pinealectomy. *Neuroendocrinology* 32:262-265, 1981.
279. YUNIS, E., FERNANDES, G., NELSON, W. i f. HALBERG. Circadian temperature rhythms and aging in rodents. *Dins de: Chronobiology.* L. Scheving, F. Halberg i J.E. Pauly eds. Igaku Shain. Tokyo. 1974. pp358-363
280. ZIMMERMAN, N.H. i M. MENAKER. The pineal: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:999, 1979.

## Bibliografia

281. ZUCKER, I., BOSHER, M. i J. DARK. Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrel. *Am. J. Physiol.* 13:R472-R480, 1983.
282. ZUCKER, I., FITZGERALD, K.M. i L.P. MORIN. Sex differentiation of the circadian system in the golden hamster. *Am. J. Physiol.* 238:R97-R101, 1980.
283. ZUCKER, I., RUSAK, B. i R.G. KING. Neural bases for circadian rhythms in rodent behaviour. Dins de: *Advances in Psychobiology* vol 3. A.H. Riesen i R.F. Thompson eds. Wiley. New York. 1976. pp35-74.

PARAMETRES MITJANS

INDIVIDUALS

RATA	TAU		A.M.	MESOR
	Minuts	Hores		
#1	1510	25.17	104.8	101.2
#2	1525	25.42	102.0	103.7
#3	1515	25.25	159.2	158.5
#4	1505	25.08	88.1	82.4
#5	1520	25.33	87.4	86.7
#6	1535	25.58	132.8	149.8
#7	1525	25.42	168.6	164.8
#8	1535	25.58	144.0	144.4
#9	1520	25.33	203.6	202.0
#10	1535	25.58	191.7	186.2
#11	1510	25.17	130.4	130.6
#12	1530	25.50	149.4	146.1
#13	1520	25.33	86.6	86.5
#14	1525	25.42	120.2	121.7
#15	1505	25.08	95.9	92.9
#16	1515	25.25	93.3	90.6
#17	1520	25.33	138.8	135.9
#18	1505	25.08	60.2	58.3
#19	1500	25.00	71.5	73.8
#20	1510	25.17	167.0	165.4
#21	1510	25.17	156.5	161.4
#22	1505	25.08	122.0	122.0
#23	1495	24.92	189.6	172.9
#24	1525	25.42	165.2	161.6
#25	1500	25.00	80.5	79.4
#26	1475	24.58	-----	-----
#27	1505	25.08	137.8	139.3
#28	1510	25.17	131.9	131.6
#29	1510	25.17	149.7	148.3
#30	1505	25.08	47.9	47.6
#31	1520	25.33	74.7	76.2
#32	1495	24.92	80.9	79.7
#33	1545	25.75	69.5	68.8
m F	1514	25.23	120.5	119.4
e F	3	0.06	9.4	9.3
n	19	19	18	18
m M	1514	25.24	125.2	122.9
e M	4	0.06	12.3	11.8
n	14	14	14	14
m T	1514	25.23	122.6	120.9
e T	2	0.04	7.4	7.2
n	33	33	32	32

PARAMETRES MITJANS

FAMILIARS

		TAU		A.M.	MESOR
		Minuts	Hores		
F.1	F m	1517	25.29	103.4	102.4
(2)	e	8	0.13	1.4	1.3
	M m	1513	25.22	111.6	109.2
(3)	e	4	0.07	23.8	24.7
	T m	1515	25.25	108.3	106.5
(5)	e	4	0.06	13.2	13.6
F.2	F m	1532	25.53	155.1	153.0
(3)	e	3	0.05	7.2	6.1
	M m	1527	25.45	197.6	194.1
(2)	e	8	0.13	6.0	7.9
	T m	1530	25.50	172.1	169.4
(5)	e	3	0.05	11.3	10.9
F.3	F m	1520	25.33	122.1	121.1
(3)	e	6	0.10	18.6	17.9
	M m	1515	25.25	108.0	107.3
(2)	e	10	0.17	12.2	14.4
	T m	1518	25.30	116.5	115.6
(5)	e	5	0.08	11.4	11.3
F.4	F m	1510	25.17	114.5	114.2
(6)	e	3	0.05	18.6	18.8
	M m	1500	25.00	155.8	147.4
(2)	e	5	0.08	33.8	25.5
	T m	1507	25.12	124.9	122.5
(3)	e	3	0.05	16.5	15.6
F.5	F m	1500	25.00	122.8	120.5
(3)	e	14	0.24	42.4	41.1
	M m	1507	25.12	134.8	135.4
(2)	e	3	0.05	3.0	3.9
	T m	1503	25.05	128.8	128.0
(5)	e	8	0.14	17.7	17.4
F.6	F m	1507	25.12	98.8	97.9
(2)	e	3	0.05	50.9	50.4
	M m	1520	25.33	75.0	74.9
(3)	e	14	0.24	3.3	3.2
	T m	1515	25.25	84.5	84.1
(5)	e	9	0.14	17.2	17.0

(n) = Nombre d'animals



DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	9.45	2.77	3.27	0.62	0.26	0.33	5.42	12.79	3.57	1.86	10.74	0.51	5.02	7.58	3.83	2.23	2.87	0.69	8.24	6.13	95.7
2	6.64	5.60	6.28	11.08	6.11	7.43	4.34	8.89	8.09	4.14	5.41	1.38	3.23	3.35	1.40	1.04	3.37	1.98	1.88	2.29	148.8
3	4.12	0.81	4.76	2.52	1.17	0.97	9.82	15.16	8.06	2.44	7.62	1.10	10.24	7.15	2.97	5.61	0.68	1.20	1.49	6.20	128.6
4	7.98	0.51	2.85	0.36	3.13	2.67	31.85	10.38	0.07	0.05	5.78	8.67	3.57	0.35	5.19	2.90	2.34	0.09	0.10	0.99	128.6
5	4.96	2.36	1.12	1.99	0.15	23.82	18.55	0.97	1.60	4.46	1.07	2.32	15.42	1.89	8.67	0.53	4.11	0.06	0.39	1.90	156.5
6	1.85	5.39	1.80	1.94	0.89	10.52	17.03	6.27	0.20	9.22	0.65	1.27	1.83	7.52	5.23	4.29	2.53	2.04	1.09	1.05	204.5
7	4.39	2.83	2.03	1.53	0.76	9.16	22.71	3.77	2.62	13.62	9.95	15.28	7.27	1.82	4.25	2.40	15.13	12.40	22.89	1.31	173.3
8	7.55	4.23	0.34	0.20	0.21	1.58	6.67	2.28	0.74	0.69	13.01	0.26	3.21	1.27	2.06	1.94	1.18	0.13	1.42	1.32	202.4
9	35.76	0.95	2.81	4.74	1.80	2.56	2.12	7.08	1.78	3.72	3.03	0.55	1.40	1.37	3.07	2.54	0.94	0.73	2.59	5.71	121.9
10	15.45	7.03	2.90	0.12	5.34	3.21	0.30	7.99	0.68	5.86	10.65	4.23	13.23	10.87	0.88	0.15	1.15	0.76	2.89	0.01	64.1
11	12.81	3.30	18.87	11.02	2.39	11.82	3.85	5.43	7.09	1.84	0.93	0.39	7.64	0.39	2.20	0.31	0.92	0.93	0.08	1.86	88.1
12	18.10	3.19	4.64	9.83	7.44	0.31	2.84	0.12	3.06	1.25	0.30	0.98	1.21	0.65	4.11	8.96	0.59	0.42	9.07	7.39	53.8
13	20.86	7.40	8.82	1.02	3.40	10.24	4.86	3.88	4.64	2.34	1.29	1.45	2.84	2.25	4.19	9.51	2.45	2.21	0.21	1.37	114.8
14	0.84	10.93	1.35	1.30	0.61	3.71	4.01	4.15	9.91	1.25	3.87	0.55	8.25	0.88	5.91	3.58	0.35	1.78	0.12	4.05	107.7
15	7.72	3.25	3.09	4.99	1.09	4.27	9.75	0.43	1.12	1.32	2.71	0.03	16.11	10.30	2.57	1.66	0.08	5.87	1.14	2.04	84.0
16	4.86	5.36	1.82	15.34	1.23	14.68	1.20	14.35	5.17	1.44	2.28	3.93	3.10	1.92	3.08	2.46	0.29	0.35	3.82	4.01	126.0
17	25.47	1.46	4.39	0.77	3.78	1.03	17.36	6.53	4.18	6.27	0.55	0.41	3.88	1.25	0.44	3.28	0.39	0.48	2.52	3.41	172.6
18	33.22	3.13	1.70	1.07	5.41	3.56	5.23	1.00	1.43	0.23	0.58	1.26	1.85	0.34	2.89	7.86	11.77	4.04	0.33	2.25	190.0
22	25.71	5.40	0.08	0.27	7.59	0.49	7.38	2.09	7.40	1.38	1.07	3.63	2.63	5.89	5.95	6.43	1.53	4.76	2.78	2.17	173.3
23	19.25	0.44	2.61	4.82	9.90	5.23	1.89	1.88	10.59	1.83	0.63	4.55	4.90	3.43	0.86	3.61	4.81	3.11	0.40	2.33	170.7
24	14.09	1.07	2.33	1.21	2.48	11.59	0.83	0.17	7.41	2.76	1.76	10.59	3.10	1.05	13.96	5.84	0.22	3.36	1.96	3.38	151.0
25	18.23	3.24	1.08	11.74	5.45	18.38	0.06	1.83	4.90	0.24	0.88	3.70	9.19	0.60	4.62	4.02	0.82	0.67	2.68	0.08	167.5
26	22.41	1.30	6.26	2.02	7.58	1.70	3.63	1.05	0.08	9.06	0.38	4.25	0.73	0.54	3.55	1.24	10.69	2.32	0.84	0.62	131.8
27	28.84	1.79	10.45	0.13	0.45	12.00	2.85	0.71	4.78	0.88	5.62	0.57	0.82	2.55	4.11	0.61	6.14	2.57	3.81	1.27	157.5
28	0.61	5.68	0.75	0.64	26.47	1.48	6.55	5.99	1.91	5.50	2.27	5.88	8.41	2.94	5.54	1.49	1.10	0.59	2.23	3.81	160.8
29	0.71	6.87	2.32	2.09	4.33	1.34	10.16	0.27	2.62	2.27	0.28	7.34	3.72	9.33	0.82	4.58	4.76	0.42	5.27	2.29	8.2
30	1.48	29.63	1.61	12.45	1.93	8.34	3.53	8.28	0.55	2.04	0.55	0.13	0.12	0.87	4.37	1.06	2.03	0.20	1.12	4.41	28.0
31	6.39	13.36	21.36	10.83	2.40	1.61	2.46	2.96	2.34	1.40	0.73	2.17	1.25	1.11	3.40	1.37	4.39	0.67	1.24	0.40	66.3
32	22.00	0.99	12.55	22.86	7.46	2.96	1.71	4.00	5.48	1.13	1.46	4.28	3.85	2.77	0.89	1.02	0.83	1.15	0.22	0.07	66.0
33	27.72	8.58	1.29	5.58	6.35	3.58	4.16	1.22	9.96	1.00	3.62	0.91	1.58	2.99	0.48	0.19	2.72	1.50	1.45	0.33	101.9
34	3.72	12.41	15.03	6.11	0.80	1.85	11.62	6.32	1.38	1.42	1.11	2.07	0.33	0.38	2.06	1.87	0.11	1.23	3.16	1.14	82.6









## #6 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
25	33.50	0.74	0.44	0.90	2.75	3.75	0.18	12.21	2.25	0.57	1.61	3.64	9.03	3.18	2.84	1.86	1.52	2.19	6.95	1.41	120.9
26	8.98	4.11	0.11	3.36	21.72	0.55	0.23	6.88	5.74	3.53	1.79	3.73	0.77	7.38	3.82	1.52	2.04	2.27	3.73	1.06	129.3
27	18.84	0.30	2.87	1.70	16.98	5.66	4.96	8.20	7.46	4.56	8.22	0.57	0.40	0.09	2.81	2.94	1.08	3.95	0.58	2.76	133.2
28	4.44	5.44	0.90	1.14	3.38	4.06	1.57	3.27	0.92	0.35	4.15	1.20	4.84	2.19	1.65	0.23	2.18	0.86	2.79	0.70	181.2
29	23.25	2.49	3.44	7.76	2.93	13.39	0.73	0.48	2.38	4.02	6.19	9.48	4.25	1.67	0.27	1.15	0.68	0.43	2.34	2.10	180.7
30	17.70	1.60	2.63	1.93	2.44	2.12	13.03	9.42	18.70	9.12	1.82	1.57	0.97	2.57	9.06	0.33	0.81	2.00	0.46	0.03	134.5
31	24.61	2.55	8.62	4.39	7.67	5.63	3.63	1.83	6.44	6.37	0.98	3.80	3.46	1.48	0.90	4.21	0.43	2.74	3.57	2.57	183.4
32	8.15	2.58	2.77	7.52	5.71	5.40	3.03	1.78	0.53	2.07	1.09	4.72	2.22	1.14	2.50	3.63	2.18	2.11	5.30	1.72	172.0
35	14.49	1.27	7.68	1.73	11.18	7.75	4.72	17.63	0.10	0.23	3.77	1.80	1.65	11.90	2.86	1.05	0.79	1.34	0.09	2.38	150.3
36	26.69	7.25	5.78	1.79	0.74	0.36	1.87	2.51	0.44	2.03	3.89	1.26	6.37	0.02	8.51	3.21	3.90	0.25	3.03	0.76	161.7
37	21.79	5.38	13.44	1.41	4.66	1.38	2.30	4.54	4.93	2.60	0.42	10.97	2.96	4.81	1.88	4.15	1.03	0.21	0.06	1.70	171.8
38	5.87	11.51	14.32	6.95	0.72	5.66	1.96	10.10	1.02	9.82	1.10	2.41	1.03	0.23	4.87	6.60	2.14	6.28	2.98	0.85	162.6
39	14.81	11.83	10.30	0.90	0.65	6.07	17.38	11.65	2.61	1.80	0.07	2.93	0.47	1.78	4.37	7.93	0.59	0.65	0.57	1.40	150.2
41	41.22	0.68	0.59	3.54	0.93	2.00	2.80	0.16	8.56	3.78	0.12	10.36	4.70	2.78	7.25	2.20	1.48	0.08	0.23	0.93	165.4
42	14.40	1.49	0.88	0.90	5.41	7.03	16.51	2.96	7.54	2.57	5.03	6.58	3.13	0.11	2.02	7.98	1.16	0.21	0.12	2.78	143.2
43	19.60	3.95	1.03	4.29	8.23	8.65	1.56	12.14	2.39	1.11	7.76	2.07	0.90	0.23	0.82	0.29	2.59	3.73	2.36	0.50	118.8
44	15.03	0.74	2.68	3.83	7.05	1.55	1.44	14.47	0.60	2.31	5.91	9.53	0.85	3.64	6.21	3.07	1.36	1.41	0.70	0.84	141.8
45	20.61	4.97	4.79	7.30	4.29	4.74	9.39	1.73	1.36	2.67	10.54	4.27	4.28	0.39	1.10	0.87	0.82	0.16	2.35	1.02	149.8

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
5	7.41	1.76	3.35	15.51	5.00	2.61	1.21	0.29	3.89	28.41	11.37	0.74	2.17	2.89	2.00	0.58	6.16	0.26	1.59	0.55	187.2
6	3.24	8.05	2.26	1.73	14.33	2.68	0.74	2.87	1.55	6.21	14.95	0.16	1.82	0.42	20.37	2.88	7.57	1.28	0.62	0.20	161.0
7	2.81	1.75	0.32	6.08	8.21	0.63	1.15	3.28	30.25	2.19	2.37	1.82	2.05	3.33	0.29	2.85	1.64	0.58	3.13	0.29	152.6
8	8.90	5.26	2.01	0.10	1.41	2.72	12.95	8.80	18.79	0.33	1.04	1.66	0.04	1.52	1.67	0.53	9.08	6.23	1.53	3.25	117.6
9	1.49	6.24	0.52	0.56	9.14	1.43	4.76	13.46	3.71	25.68	1.17	4.88	4.12	0.78	3.35	0.34	1.33	3.77	2.03	0.70	93.0
10	5.81	5.02	1.62	2.45	33.46	6.46	0.99	0.20	9.68	1.49	6.76	6.75	1.82	3.29	0.04	0.24	3.05	2.01	2.15	2.37	115.2
11	3.02	2.65	2.18	8.79	6.32	7.50	3.09	10.26	7.20	4.14	4.55	2.61	0.65	3.41	5.06	0.65	6.59	1.30	5.07	1.39	96.5
12	4.09	6.82	0.85	0.41	3.76	15.32	10.43	0.44	4.27	4.32	10.75	2.36	0.26	6.07	4.94	9.13	1.52	0.81	0.82	0.75	164.4
13	0.35	23.53	2.29	6.46	0.80	3.43	0.65	12.22	0.91	1.25	1.27	4.04	2.14	0.21	10.86	0.82	5.86	0.51	2.01	6.63	85.9
14	7.75	5.91	0.35	0.66	11.14	2.53	2.44	2.59	2.46	2.26	0.64	0.12	7.57	5.49	4.30	3.77	0.42	20.14	1.13	12.00	117.0
15	4.58	7.35	2.87	1.33	0.98	10.54	4.97	0.25	8.24	1.84	1.91	15.61	1.02	14.30	3.52	1.79	0.96	4.94	0.18	7.48	120.3
16	1.97	7.97	0.61	1.58	4.03	7.38	2.39	4.69	2.56	4.29	3.19	0.73	5.49	5.72	0.31	4.09	6.18	1.55	7.69	2.63	123.7
17	10.84	0.88	1.22	10.41	18.49	3.72	0.49	4.84	6.80	1.32	0.80	1.70	2.39	1.43	9.19	2.19	2.30	3.54	4.84	4.42	128.6
20	19.86	5.71	0.01	0.67	2.00	5.94	0.64	0.27	3.39	14.34	19.01	8.40	4.29	0.22	0.11	0.09	1.24	2.94	0.12	0.06	129.9
21	20.45	5.92	4.31	6.43	0.08	8.93	3.65	5.79	0.01	10.28	1.65	1.60	1.32	5.52	0.54	0.36	0.65	2.33	4.28	2.26	146.5
22	20.68	1.89	3.88	0.94	0.87	13.96	15.22	1.60	14.57	2.85	1.37	0.13	0.45	1.33	3.68	8.70	2.79	1.08	0.02	0.45	115.9
23	35.79	1.86	0.29	1.67	2.34	2.27	15.78	9.25	2.66	1.40	2.51	2.94	3.20	0.97	1.36	1.18	0.32	1.92	5.94	5.13	142.5
24	6.59	0.12	1.29	0.02	0.14	0.19	0.31	6.97	0.99	6.33	1.74	0.24	1.90	5.82	0.56	3.70	2.57	0.42	4.99	3.92	149.8
25	12.74	4.84	1.83	3.77	1.88	1.71	15.57	0.19	0.43	0.52	23.75	6.01	5.60	0.32	0.66	0.69	0.99	5.21	0.20	4.34	90.4
26	1.90	6.77	0.41	8.08	3.16	11.50	4.96	21.38	6.05	4.26	1.49	5.77	4.00	1.19	8.05	0.31	2.05	2.85	0.04	0.89	82.6
27	8.13	11.23	3.52	0.07	3.84	10.53	12.11	0.86	6.56	0.17	9.81	2.01	4.99	6.07	2.81	1.93	2.70	0.31	1.60	3.94	131.2
28	13.18	3.33	2.60	2.47	1.00	4.68	11.04	0.85	1.98	2.38	3.52	3.26	1.80	3.11	1.70	3.36	0.45	0.96	2.27	2.71	149.4
29	9.87	5.06	1.90	1.72	1.13	23.22	1.37	8.20	1.47	0.91	1.19	0.57	20.00	4.30	0.60	0.21	2.83	3.64	1.04	1.88	150.4
30	11.21	1.19	9.57	0.03	1.05	1.13	15.77	2.43	16.93	5.32	1.03	7.45	0.63	2.48	4.57	0.93	0.74	4.63	1.39	0.58	132.5
31	23.54	0.05	5.40	8.57	20.07	2.16	1.12	2.99	5.13	1.92	4.52	0.72	6.19	2.39	0.60	3.49	2.77	0.84	1.11	0.03	164.2
32	7.98	4.56	2.02	0.69	0.71	1.21	1.13	3.02	4.55	0.81	0.22	2.20	1.04	1.40	0.33	0.77	2.33	1.62	1.34	1.91	196.5
33	13.22	8.19	3.44	6.50	2.07	9.68	0.34	9.64	6.88	11.53	10.50	1.34	2.78	4.06	1.74	2.56	1.99	0.13	0.76	0.18	170.5
34	4.81	2.39	1.66	5.55	5.99	25.59	1.15	2.24	1.12	1.10	0.46	4.08	6.14	3.10	8.29	5.21	1.62	1.13	0.28	0.27	217.6
35	4.85	3.41	2.05	6.59	0.05	7.18	14.23	0.25	5.32	0.66	1.43	4.53	0.22	24.09	3.91	4.51	1.10	0.71	3.30	1.09	215.3
36	18.95	12.55	1.02	1.38	2.20	1.36	2.67	1.36	5.20	6.41	11.96	1.71	2.24	5.88	1.26	0.51	0.65	2.42	0.05	0.57	212.8
37	11.02	3.76	0.49	4.96	19.04	7.06	0.37	0.42	0.14	15.05	3.57	1.26	2.11	1.21	0.78	1.28	3.09	0.08	9.04	0.57	210.4
38	21.34	1.45	1.56	0.77	10.81	8.29	10.67	2.31	0.76	6.53	2.12	2.96	1.05	8.75	2.90	1.89	0.54	0.40	5.55	0.73	205.1
39	13.24	16.67	1.97	10.03	3.66	9.63	2.47	8.51	7.83	0.87	2.06	0.85	7.09	0.60	2.43	0.98	1.64	0.67	0.59	1.95	180.0
41	37.22	2.39	3.28	0.88	2.07	1.26	2.64	0.85	3.52	4.75	2.22	0.95	9.30	2.11	0.51	2.17	0.30	4.53	2.81	2.01	180.2
42	31.29	2.77	0.04	2.31	1.61	0.42	0.36	5.84	5.63	9.63	2.08	10.64	0.86	7.64	4.85	1.60	2.43	3.00	2.59	0.20	185.7
43	20.61	3.76	1.88	0.20	4.59	10.41	3.75	4.13	9.18	1.60	1.50	0.02	1.14	1.70	0.65	7.83	1.14	1.10	2.61	1.81	167.1
44	29.83	1.03	1.37	1.44	6.32	0.82	1.26	0.54	1.59	1.84	4.95	2.92	7.29	0.15	0.89	1.08	5.90	4.14	2.59	4.03	168.5
45	23.85	5.87	1.81	0.74	0.70	1.31	0.00	7.57	11.14	3.12	8.09	1.60	1.41	2.76	2.10	0.83	1.72	5.66	0.47	4.32	180.7

## #8 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
5	12.78	12.59	9.61	5.22	7.50	0.00	3.27	1.18	1.19	9.96	1.13	1.86	6.05	3.23	0.23	0.53	2.11	0.22	1.48	4.91	162.8
6	3.97	8.37	10.84	1.24	1.16	1.46	6.36	6.17	1.62	2.91	10.48	9.76	0.39	2.26	0.99	3.77	1.62	1.23	2.52	2.71	157.2
7	1.95	10.00	0.28	0.38	7.72	7.19	6.16	8.92	11.02	4.41	3.97	5.01	9.74	0.34	3.08	7.19	0.45	2.28	3.41	0.43	95.8
8	6.39	6.24	3.60	0.70	3.12	4.15	12.65	6.60	9.02	0.43	7.14	0.62	4.84	2.68	4.36	2.92	1.53	6.72	4.14	0.90	70.7
9	0.64	0.95	3.68	7.66	0.85	1.19	5.88	26.77	2.43	11.74	3.24	5.14	0.04	0.03	4.99	3.40	2.30	2.91	3.28	2.24	77.1
10	8.88	3.81	1.36	5.77	5.29	0.97	6.21	6.12	16.92	14.28	1.09	1.58	2.02	1.76	0.46	0.99	5.70	6.86	2.57	0.23	94.1
11	4.42	9.52	0.32	2.44	1.80	2.57	3.26	1.02	19.54	12.34	11.28	4.01	1.85	3.19	2.69	1.68	3.09	3.76	1.17	3.08	68.0
12	22.03	0.51	5.41	3.50	10.33	10.04	4.90	2.00	6.29	3.55	3.30	4.89	5.36	3.69	0.08	3.18	0.59	0.14	0.79	2.88	84.1
13	8.66	3.48	3.97	6.38	1.32	7.10	14.47	1.37	7.73	16.40	0.28	1.66	0.49	8.40	2.85	2.86	1.38	0.50	2.88	1.06	58.8
14	15.35	4.07	4.37	4.54	2.25	0.61	0.95	0.68	0.33	8.56	13.04	11.69	13.47	5.44	2.03	3.60	0.24	0.11	0.22	0.29	52.2
15	20.50	4.94	0.15	3.50	16.14	5.23	5.66	3.33	2.22	1.21	0.80	0.60	12.21	6.92	1.62	1.58	0.22	3.48	2.28	1.87	107.7
16	3.47	7.48	0.15	5.21	0.30	4.46	3.64	0.93	3.42	1.48	10.73	7.90	9.86	10.17	0.53	2.00	1.18	4.43	0.00	1.77	106.5
17	12.47	0.42	2.77	3.55	3.79	3.48	26.96	14.13	8.82	0.77	0.79	2.13	3.33	3.27	2.30	0.54	1.92	0.97	1.84	1.77	103.9
20	12.69	5.99	3.91	4.13	1.38	9.58	5.04	12.41	0.99	9.27	0.32	3.56	4.97	1.93	4.47	0.71	0.38	7.84	1.01	1.29	138.2
21	19.15	1.07	3.40	3.38	2.58	3.81	8.35	7.27	1.07	3.02	3.13	11.13	4.05	2.47	2.52	3.55	0.13	0.48	1.19	1.10	146.8
22	24.47	1.25	0.23	10.68	17.41	0.13	2.55	1.21	5.61	0.39	7.78	0.87	1.48	2.73	0.06	0.09	1.78	0.37	0.36	3.67	134.2
23	25.16	0.03	0.62	2.95	2.68	0.76	0.40	10.54	0.71	2.40	9.31	0.02	0.23	0.57	1.10	0.62	4.06	4.94	16.03	2.80	147.4
24	2.81	0.46	0.06	0.41	0.19	5.27	6.98	7.41	5.74	0.62	1.80	6.56	0.06	0.91	0.39	0.92	0.58	0.69	3.52	3.39	126.3
25	7.27	1.67	8.23	1.82	2.27	1.70	0.99	11.46	11.82	0.41	16.04	0.73	1.21	4.47	2.90	0.59	0.95	6.07	4.75	1.38	161.5
26	10.27	1.73	3.64	1.42	10.04	7.41	0.54	2.69	1.39	8.77	0.90	12.07	3.13	1.10	2.31	7.65	3.37	2.36	0.19	1.92	122.2
27	21.39	1.31	1.65	0.03	5.16	1.26	0.99	13.02	2.34	3.58	1.26	4.31	0.38	9.59	3.06	9.63	2.42	4.68	0.81	3.37	158.0
28	6.93	2.44	0.14	1.88	2.84	2.10	4.27	4.80	1.16	2.02	0.05	0.78	0.00	4.19	1.21	0.31	3.13	7.76	0.38	3.90	169.8
29	11.29	10.96	4.05	2.01	6.10	2.44	3.83	6.31	1.32	4.09	0.16	3.36	12.74	0.79	3.53	4.11	1.62	6.33	4.20	10.59	140.2
30	10.75	2.64	4.09	0.38	3.97	14.03	5.14	3.49	6.17	14.70	3.25	4.66	5.80	2.02	0.46	0.90	4.44	2.38	4.44	1.81	149.7
31	22.25	3.50	3.45	0.52	1.97	11.09	2.99	2.61	3.91	3.02	4.97	10.65	2.86	5.06	0.26	4.59	1.10	0.90	0.57	1.44	140.4
34	26.77	0.54	7.05	2.57	1.31	0.31	20.96	5.42	1.43	0.76	0.38	0.87	2.32	6.04	1.64	4.33	2.01	0.62	1.38	2.23	149.0
35	24.97	0.60	3.56	9.36	1.40	5.43	0.34	0.11	2.81	11.26	0.73	0.18	3.10	0.21	3.65	1.35	2.13	1.66	0.74	0.22	129.4
36	16.50	2.38	1.14	0.86	6.77	5.65	1.19	1.64	2.61	11.68	1.05	0.47	0.06	3.18	14.02	5.52	0.60	0.61	1.59	3.90	116.0
37	22.06	3.84	1.80	0.20	4.60	8.53	4.90	0.46	5.53	0.83	0.03	0.49	4.92	1.65	1.26	2.96	1.28	0.35	1.87	0.62	188.1
38	18.50	0.66	2.75	13.27	8.50	0.20	2.76	1.36	11.74	5.09	3.43	3.81	3.37	1.83	0.94	8.19	1.22	1.86	0.53	7.25	174.6
39	16.13	2.76	2.66	2.97	4.13	1.54	2.81	8.78	9.27	13.08	4.63	0.23	7.21	0.36	0.49	1.27	2.60	8.58	0.49	0.17	140.3
41	22.68	1.36	1.79	1.49	4.14	1.07	7.96	10.66	7.10	5.05	2.09	0.30	3.45	3.64	4.54	12.15	1.66	1.31	0.76	3.18	121.8
42	0.39	9.06	4.94	4.64	0.26	0.72	5.24	2.36	1.75	0.21	13.44	2.12	1.55	3.94	4.71	9.33	1.48	13.44	1.15	4.16	143.9
43	29.56	1.18	6.07	7.66	0.85	5.30	6.43	1.13	2.79	0.98	1.64	1.88	0.42	10.15	0.79	3.29	0.32	3.23	5.07	0.19	111.3
44	4.91	9.81	7.43	1.39	0.95	13.12	1.84	6.84	9.25	0.82	1.20	1.91	1.18	7.39	4.94	6.18	1.27	1.91	3.37	5.80	170.4
45	11.69	16.72	6.01	1.08	3.85	2.66	3.87	5.76	7.02	1.32	2.35	4.05	2.70	0.93	4.21	2.79	2.03	1.54	1.18	2.48	122.5

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	P.M.
5	5.12	3.84	0.56	1.45	0.54	1.51	26.63	6.56	10.27	2.78	3.93	13.38	0.45	2.15	4.36	2.00	1.70	1.47	0.96	3.83	147.2
6	3.19	2.25	2.17	0.51	0.15	0.68	18.03	11.36	2.19	22.92	6.84	4.05	0.89	3.10	3.43	3.55	1.80	0.20	1.36	1.68	124.6
7	7.59	0.16	0.39	0.51	0.19	0.07	14.75	3.14	16.84	1.24	22.62	11.86	0.24	0.67	2.41	10.51	0.88	0.54	0.12	1.66	140.4
8	3.28	0.54	1.29	3.78	0.04	8.79	3.78	10.62	5.96	32.34	0.06	5.13	0.49	0.78	1.03	5.37	2.31	4.42	2.46	1.09	141.2
9	6.31	1.79	2.88	1.59	11.15	10.53	18.01	4.02	4.75	6.33	0.03	1.39	9.62	5.11	0.60	1.53	2.97	0.49	0.21	3.20	110.8
10	7.64	0.48	2.73	5.20	20.86	10.95	0.99	4.73	24.75	0.18	2.94	1.60	1.55	2.46	3.52	4.10	0.52	0.66	0.07	0.40	140.5
11	4.28	1.38	5.67	7.94	1.07	8.59	25.69	9.73	2.13	1.11	4.01	2.19	5.85	0.56	6.07	1.26	4.78	1.92	3.44	0.21	162.4
12	4.67	2.70	0.39	12.39	15.75	8.50	0.99	0.49	3.11	15.37	7.90	1.05	2.74	1.10	0.05	2.47	0.31	6.82	4.37	4.53	192.3
13	8.90	7.76	1.34	0.73	5.23	0.09	4.42	8.81	4.58	9.59	3.48	2.03	8.12	7.21	1.69	3.19	7.06	5.74	1.36	0.79	140.5
14	10.96	1.91	3.00	0.45	12.92	2.94	21.65	1.52	0.57	4.69	0.51	5.68	5.37	3.41	3.67	6.70	1.82	6.38	0.17	0.46	147.7
15	6.65	4.18	2.12	5.71	11.77	0.76	2.99	7.18	32.18	3.14	3.61	0.84	5.12	0.98	1.77	0.12	2.64	0.46	0.12	2.62	145.1
16	13.12	7.69	2.88	0.07	11.25	11.94	1.82	2.85	0.37	3.01	22.47	8.38	3.92	1.79	0.66	2.20	0.92	0.11	1.29	0.03	153.7
17	9.75	0.10	0.52	7.95	4.08	4.87	1.09	5.99	24.46	8.04	0.52	6.38	6.73	6.40	0.49	0.31	2.76	2.64	2.02	0.51	154.6
20	16.86	2.52	0.78	3.76	1.50	11.59	10.66	0.67	1.42	12.45	1.52	5.27	8.73	5.12	2.82	0.25	1.97	0.73	0.25	0.55	156.6
21	15.05	2.88	0.06	8.22	8.92	2.97	0.59	8.91	6.19	6.03	8.11	6.84	1.27	3.97	1.61	1.99	2.34	1.46	4.09	2.45	196.6
22	17.52	1.10	8.27	4.75	25.05	8.55	3.58	1.85	0.01	0.76	0.56	1.65	7.17	2.10	0.81	5.16	1.23	1.11	0.09	0.62	163.2
23	27.25	2.41	1.18	7.91	0.26	1.45	16.83	1.42	8.94	2.45	6.99	1.39	6.65	0.79	0.01	0.16	1.77	2.35	2.62	0.79	213.0
24	16.17	6.49	1.90	11.57	0.92	1.02	0.10	3.05	0.07	2.07	7.40	0.42	0.44	0.51	1.03	0.70	0.62	1.85	0.61	0.46	167.3
25	12.09	0.57	0.14	1.42	0.91	13.70	3.77	6.25	10.77	6.32	5.41	6.26	0.06	13.27	1.11	2.37	5.26	0.49	1.31	3.17	200.3
26	15.70	0.63	8.64	13.12	7.63	10.70	18.92	3.87	1.51	0.94	5.97	1.44	2.69	0.62	0.48	0.21	2.34	0.22	0.23	0.09	219.3
27	23.10	2.06	0.11	3.11	7.47	23.85	2.56	0.02	19.61	0.85	1.67	1.48	0.88	0.41	3.47	0.57	0.44	1.30	0.66	0.22	223.6
28	20.02	2.75	10.08	14.97	0.66	3.81	16.72	0.95	3.11	3.77	5.94	0.55	3.10	2.11	1.48	2.14	1.80	1.64	1.20	0.42	240.5
29	8.67	1.23	0.90	17.71	9.55	5.04	4.83	1.45	0.93	4.76	2.08	0.70	6.97	6.24	4.14	8.55	0.85	0.82	2.71	5.56	210.9
30	16.48	0.06	2.64	0.48	12.03	5.30	14.55	13.50	5.33	6.17	1.28	3.17	1.18	1.11	1.39	0.40	3.39	2.51	2.11	3.66	218.1
31	15.79	1.85	5.30	4.60	15.04	3.87	3.79	5.67	15.90	1.50	1.44	0.70	5.65	0.12	1.88	0.62	3.19	1.91	4.27	4.38	186.9
32	3.76	1.95	0.63	5.19	11.35	4.03	2.63	4.46	0.63	0.06	7.93	0.94	1.46	0.68	0.98	0.46	0.56	2.94	1.06	0.36	217.8
33	9.35	10.60	8.75	2.80	4.63	0.95	14.24	4.08	5.52	3.20	5.41	0.28	7.23	9.64	0.47	6.08	0.36	1.83	0.98	0.83	208.3
34	7.31	12.29	1.33	16.09	6.87	4.20	1.90	1.73	3.90	5.09	9.42	4.15	4.96	2.59	0.02	10.24	0.72	2.42	1.29	0.30	218.9
35	6.69	10.82	0.81	5.57	0.96	2.16	2.75	6.54	10.06	10.87	1.89	8.12	6.59	6.36	1.57	1.35	8.22	1.41	1.10	0.06	187.3
36	12.49	15.99	20.73	3.51	6.49	2.02	0.83	2.07	0.99	1.43	0.33	1.02	8.37	4.71	1.29	0.20	1.96	3.81	6.28	0.40	212.6
37	16.90	2.35	1.00	9.04	0.62	6.02	5.19	2.57	23.94	0.24	4.73	0.87	3.27	2.09	1.26	3.20	0.75	3.28	0.79	2.58	186.9
38	17.44	0.65	0.42	9.43	20.66	5.67	7.34	0.86	4.45	4.68	1.73	1.80	1.53	2.52	0.81	6.99	0.36	0.95	0.02	5.94	192.0
39	22.43	14.05	0.26	8.66	6.30	10.51	2.59	1.93	0.21	3.44	5.83	1.68	1.67	1.64	9.02	0.44	0.33	1.54	0.26	0.34	204.5
41	25.59	0.69	3.09	0.26	2.86	18.15	1.75	1.00	1.41	4.20	2.70	1.61	6.53	8.57	1.88	0.23	5.19	1.87	1.80	3.87	205.5
42	12.22	0.98	2.52	15.04	11.11	7.52	2.48	3.23	0.26	0.29	2.80	8.11	8.32	1.19	0.87	4.03	0.25	2.28	1.48	8.56	213.9
43	35.73	1.89	0.96	6.21	8.20	3.69	4.50	0.84	1.11	0.85	0.16	3.52	2.60	1.70	0.09	1.99	1.02	8.83	3.02	0.78	203.5
44	18.02	1.26	10.83	0.47	18.01	0.23	8.80	2.51	3.75	2.92	0.92	2.61	2.22	0.16	5.01	0.23	3.48	4.82	0.09	2.46	175.6
45	24.23	2.98	1.26	2.52	4.29	1.67	3.54	3.28	1.83	6.93	5.48	15.49	7.60	0.44	0.54	6.66	1.15	3.35	0.20	0.55	181.7

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
5	1.48	8.09	1.17	3.08	1.96	2.04	17.52	5.69	0.11	1.78	16.00	7.05	11.50	1.78	5.94	1.47	0.99	1.84	0.18	4.69	123.6
6	8.64	0.18	0.13	3.97	4.20	7.11	13.14	1.20	3.51	17.67	7.63	6.40	0.35	0.37	3.49	0.13	6.41	0.10	5.20	1.78	108.0
7	1.65	6.78	3.40	0.65	3.30	8.37	5.38	6.67	16.28	0.13	3.63	11.36	1.19	7.27	1.24	9.83	2.39	0.22	3.65	0.63	134.9
8	1.66	0.77	4.00	6.19	3.93	16.96	1.14	0.71	0.45	14.37	1.46	3.44	8.89	13.57	0.82	2.05	0.90	0.15	7.63	3.56	112.0
9	2.66	3.48	5.11	15.73	0.59	1.08	5.59	23.21	5.42	5.48	0.85	3.30	1.32	1.43	0.06	8.89	1.16	3.59	1.34	1.78	78.5
10	3.86	4.35	2.58	15.18	0.65	10.94	2.38	12.19	2.32	3.72	11.24	8.77	7.95	1.13	3.21	0.80	0.70	0.32	0.05	1.41	81.8
11	4.57	9.93	6.10	0.34	13.45	2.50	0.21	2.81	0.55	1.21	13.41	4.57	0.66	2.23	0.32	5.87	0.87	2.94	9.13	1.81	119.9
12	1.61	16.22	16.43	1.93	2.98	1.58	8.62	4.22	5.10	2.11	1.00	1.59	7.07	0.63	7.25	4.88	1.20	2.61	1.38	3.09	116.4
13	1.29	12.97	6.63	0.28	1.10	10.21	1.75	1.91	14.71	8.63	1.28	8.46	5.49	0.50	4.32	0.18	0.10	1.74	1.72	4.96	149.9
14	8.54	0.20	4.38	0.10	4.73	6.66	0.26	3.12	1.09	15.54	13.75	0.84	1.97	2.47	3.21	1.93	1.28	6.10	1.80	0.45	115.2
15	4.55	2.23	2.28	7.27	19.47	2.84	2.86	16.47	1.43	3.12	6.04	1.47	7.44	1.15	9.88	0.23	1.91	2.16	0.74	0.47	140.0
16	5.05	4.26	2.16	0.87	0.10	2.64	6.01	20.89	7.26	2.42	9.76	5.02	2.38	1.57	0.54	2.58	1.00	0.57	7.01	0.36	127.5
17	10.06	9.68	0.29	0.66	1.53	2.72	6.16	4.74	12.85	2.42	4.14	0.70	3.89	2.33	1.73	5.48	4.45	2.04	1.38	2.06	114.4
20	6.06	0.84	2.59	2.11	12.92	0.56	1.44	0.04	4.21	10.38	0.58	6.22	3.94	9.61	6.79	1.47	6.80	0.34	3.01	3.44	170.4
21	20.51	0.65	3.77	0.73	6.17	10.49	10.04	12.24	4.33	3.44	1.79	1.90	2.41	1.04	3.80	1.87	3.70	0.60	0.06	2.35	126.3
22	17.29	0.74	12.52	7.39	12.15	0.04	3.64	1.19	2.67	2.47	1.58	6.67	3.35	11.92	1.69	1.96	0.58	1.31	3.72	2.17	143.6
23	22.47	5.28	3.41	6.16	0.43	6.48	5.57	10.44	0.69	2.63	2.26	7.47	7.81	0.30	0.75	3.59	1.02	0.21	3.06	0.75	201.0
24	0.30	0.18	5.33	2.08	1.70	2.47	3.49	5.51	3.62	0.45	1.07	1.04	1.89	3.27	1.30	3.39	3.18	0.92	2.27	0.88	220.8
25	7.61	6.35	0.97	0.44	0.06	24.10	0.73	10.45	0.60	4.57	10.45	0.65	0.24	1.85	3.64	5.69	6.27	3.88	0.82	0.46	197.7
26	7.17	10.36	9.35	2.40	4.54	12.60	0.09	6.09	6.91	0.37	3.32	0.53	4.89	4.66	2.10	2.57	5.29	1.21	0.23	6.04	133.0
27	14.56	15.90	0.23	5.16	14.48	2.37	3.03	6.91	1.79	6.52	0.02	2.10	1.20	5.77	6.64	1.40	0.93	3.67	1.42	1.81	198.0
28	9.62	2.17	0.96	1.47	2.70	15.28	1.07	1.06	2.78	0.52	0.10	3.21	1.30	3.49	0.85	2.84	1.15	2.35	0.11	0.10	208.7
29	7.30	7.14	3.78	4.79	5.22	3.58	9.30	3.93	2.87	6.44	7.08	0.39	9.06	1.64	4.11	0.30	12.16	1.47	7.86	1.51	204.3
30	9.35	5.36	4.14	4.72	3.15	8.25	7.70	9.03	9.32	1.46	3.28	1.93	3.11	1.87	3.66	0.14	3.63	0.78	0.27	4.11	196.1
31	13.63	4.33	0.95	1.46	12.22	10.60	0.21	12.84	1.18	0.66	11.56	2.38	7.34	3.27	6.98	0.51	0.58	0.31	1.26	3.94	207.5
32	9.21	3.50	5.03	4.58	1.25	2.33	5.86	0.54	0.05	0.10	3.44	2.53	2.30	1.96	0.88	2.70	0.24	1.26	2.43	1.15	182.9
33	39.30	5.43	3.97	4.00	6.91	3.33	1.06	0.76	2.58	0.37	9.97	2.68	1.73	3.13	1.33	0.94	0.13	1.82	1.50	2.29	163.5
34	12.43	2.57	12.89	9.37	0.65	3.27	19.96	2.54	7.77	0.06	0.58	0.24	1.75	5.64	0.68	0.12	2.16	5.31	0.54	1.05	197.5
35	9.82	6.75	7.53	0.98	1.22	10.58	2.37	2.02	28.19	6.80	3.11	3.35	1.17	1.98	0.81	2.41	3.99	1.04	0.86	1.29	184.7
36	10.62	3.71	3.09	12.80	10.89	16.93	3.70	1.42	2.59	8.80	4.04	4.77	5.29	1.89	0.40	0.71	0.88	0.32	0.41	1.84	222.0
37	16.10	3.37	2.92	3.38	19.16	5.27	9.78	0.74	1.73	8.62	3.21	1.31	1.98	6.24	2.95	0.93	2.37	0.27	0.79	0.01	204.6
38	19.55	2.48	1.78	0.78	5.70	6.77	5.14	0.91	2.96	5.55	9.77	5.54	7.14	1.99	0.70	0.64	0.74	4.53	1.19	3.14	206.9
39	32.15	6.22	7.08	9.63	1.92	14.71	3.13	0.41	4.81	1.95	0.05	2.38	0.47	2.56	4.97	1.90	1.09	1.96	1.09	0.46	223.6
41	21.55	4.11	0.70	3.20	7.28	9.23	10.41	9.75	0.81	1.29	4.24	0.45	4.41	1.68	3.53	3.48	1.64	0.89	0.39	6.63	144.7
42	20.99	4.21	0.60	0.41	3.51	3.33	7.47	1.80	16.73	2.37	2.60	7.47	1.32	0.45	2.49	1.75	2.07	5.00	0.12	10.86	175.2
43	19.68	5.65	2.38	2.88	5.06	21.69	5.68	7.84	3.74	0.89	4.48	3.36	3.09	0.18	2.76	1.42	1.13	1.81	1.52	3.19	185.1
44	20.74	1.88	1.49	1.91	8.13	6.25	4.29	7.21	6.26	3.72	7.83	4.56	1.69	0.63	1.04	1.12	1.39	0.22	9.68	0.17	193.2
45	13.46	7.85	2.58	2.44	3.59	12.35	1.69	8.93	5.34	4.22	3.61	4.33	2.32	7.69	0.29	0.41	0.68	0.52	0.47	1.15	175.2













DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
2	1.22	1.94	0.32	2.87	0.24	4.91	3.20	5.47	1.60	4.71	18.54	0.22	0.16	9.15	3.05	2.09	2.30	3.24	2.29	2.14	44.8
3	2.18	1.29	1.75	1.73	2.60	1.23	0.41	2.27	0.30	13.21	1.24	34.55	2.55	3.06	2.34	1.21	4.78	3.35	0.69	3.45	82.0
4	0.67	1.25	2.80	1.46	0.46	1.47	3.08	1.21	0.33	6.00	10.19	27.79	4.91	4.26	9.17	1.80	1.57	1.26	2.24	0.89	92.1
5	0.83	0.52	0.57	0.60	1.25	3.87	1.05	5.01	0.86	7.33	6.17	0.08	2.58	0.33	1.81	4.22	0.74	1.87	1.62	0.75	116.5
9	0.17	0.02	0.42	21.08	3.95	0.46	2.39	20.34	7.07	3.48	8.16	6.73	4.51	0.66	1.84	0.14	6.69	2.98	0.58	1.16	119.8
10	1.67	0.88	1.84	5.43	2.57	1.89	25.74	0.76	0.33	1.76	6.06	2.72	2.19	4.62	0.17	0.97	2.42	1.85	0.57	1.95	130.2
11	3.43	0.66	2.06	6.28	1.45	0.77	23.70	12.07	4.75	12.12	1.04	3.66	0.33	0.05	1.66	1.15	3.70	2.04	0.92	2.46	170.7
12	0.11	1.20	2.65	1.63	10.98	11.37	18.03	6.00	0.02	2.10	9.02	13.31	0.11	5.48	1.30	1.98	1.52	5.32	0.24	1.56	123.7
13	1.88	0.83	1.72	0.06	11.38	9.73	5.61	9.42	5.07	9.44	5.31	9.50	6.41	3.59	1.86	0.30	4.94	1.34	0.58	0.44	142.5
14	8.48	0.64	4.25	0.81	21.48	9.56	4.80	2.91	5.91	2.65	4.52	12.04	1.65	4.00	1.75	1.99	9.14	0.74	0.25	1.49	109.5
15	0.27	1.38	0.65	3.00	4.30	17.16	3.79	16.36	0.59	2.23	10.64	4.52	0.61	7.82	0.26	2.98	5.38	3.78	1.82	1.25	76.3
16	1.09	1.17	1.79	0.41	10.64	1.21	10.25	32.58	1.40	10.08	0.18	1.52	5.51	2.25	3.75	2.99	0.09	4.70	0.34	1.80	119.2
17	3.78	5.10	4.76	3.92	4.33	14.01	5.34	12.24	7.62	4.67	8.95	7.61	5.13	10.93	3.50	5.27	2.40	7.07	5.06	6.15	64.3
18	0.32	0.65	0.58	0.17	2.76	5.71	14.20	5.45	5.50	1.32	13.02	17.70	4.27	1.85	3.27	0.11	2.07	3.75	0.90	2.13	87.1
19	8.83	2.38	3.45	2.83	8.15	14.65	13.06	4.21	5.17	7.49	1.46	5.77	1.68	3.29	3.95	2.30	0.04	2.26	4.09	0.34	67.5
20	4.75	1.30	0.51	1.12	0.95	13.88	0.59	0.54	3.68	2.76	4.13	0.75	6.68	1.56	4.77	1.02	1.27	2.04	0.72	0.27	85.3
21	1.80	0.57	0.06	0.07	2.69	12.68	4.42	16.20	5.58	6.67	2.08	4.31	3.84	13.70	2.20	4.09	2.45	0.89	5.69	2.21	90.3
26	22.68	2.93	2.11	4.91	7.04	4.11	13.92	5.81	1.40	1.07	2.13	6.25	4.83	1.32	5.02	0.63	0.27	0.19	3.48	3.67	48.7
27	21.36	19.68	6.42	1.86	7.11	6.06	1.70	5.47	0.96	0.73	0.12	6.78	0.48	3.68	0.27	1.13	0.70	5.34	0.11	1.75	75.6
28	16.12	2.80	2.04	1.19	0.68	11.93	1.03	0.82	8.08	13.61	1.06	6.15	3.40	0.74	4.28	7.17	1.80	4.33	2.75	0.21	114.2
29	4.81	3.69	5.00	11.16	3.85	32.86	3.25	0.71	2.86	1.85	7.21	4.08	0.21	3.87	1.04	2.01	0.32	1.52	0.22	5.02	94.0
30	15.51	0.05	2.32	3.89	21.79	15.63	13.19	1.27	0.58	0.83	0.65	4.06	1.14	3.31	0.65	0.82	0.20	0.39	2.76	2.03	62.9
31	42.90	63.48	37.04	24.74	43.48	52.70	46.26	73.73	5.96	28.81	20.24	20.92	20.28	4.88	29.53	19.59	6.15	5.55	9.85	1.13	51.1
32	16.30	1.58	1.98	1.11	4.86	4.57	5.13	13.36	0.75	7.28	0.04	1.86	9.51	5.17	2.09	1.14	0.08	1.57	0.13	0.66	81.8
33	9.88	4.74	2.99	15.72	8.52	11.85	7.72	8.37	6.95	0.72	2.77	4.13	0.73	2.51	2.12	1.05	0.51	1.74	0.22	0.72	83.6
34	10.03	0.83	0.63	0.00	4.85	2.18	20.26	14.27	1.24	2.32	2.97	5.40	0.94	0.18	2.67	1.69	5.48	4.51	0.32	1.50	64.0
36	29.18	0.63	0.63	4.45	1.31	0.79	0.93	1.99	11.86	0.24	6.88	0.89	2.09	2.06	3.25	3.58	0.63	9.72	0.20	2.94	109.3
37	1.01	23.51	3.20	5.56	4.66	4.43	0.17	4.79	5.92	2.17	0.82	4.36	5.99	0.07	0.42	3.16	0.73	6.24	4.99	1.02	89.6
38	0.79	14.54	1.03	0.74	7.40	12.11	0.59	15.54	12.54	3.52	3.51	8.72	9.21	0.10	0.01	1.97	1.08	1.83	0.02	0.63	82.1
44	26.76	5.06	7.40	7.44	2.60	0.30	7.29	5.26	1.64	4.08	1.65	1.55	1.20	0.58	2.85	5.49	4.88	0.74	3.13	1.77	79.4
45	3.87	8.64	1.12	8.87	18.63	4.81	0.74	1.25	6.29	0.69	2.28	5.31	2.22	0.76	11.30	0.52	0.93	0.37	2.87	4.19	104.2
46	1.60	5.80	1.36	6.96	19.35	9.46	8.41	3.63	1.14	0.33	2.01	10.17	1.06	1.40	1.69	0.05	0.04	5.10	0.68	0.41	79.2
47	33.26	16.07	16.05	2.41	0.97	3.30	5.48	0.89	1.07	6.22	0.07	0.76	0.37	0.62	0.04	0.07	0.82	1.08	2.02	1.16	110.5
48	3.45	3.71	1.02	0.56	0.59	1.27	0.42	1.28	0.28	0.26	0.27	0.48	0.59	1.19	0.41	0.55	0.53	0.38	0.70	0.11	125.5
52	23.27	7.50	1.42	2.08	0.71	11.12	4.15	8.13	15.00	1.57	0.83	0.98	0.82	0.65	0.09	0.66	3.13	2.15	1.99	0.58	76.9
53	10.20	0.79	9.01	3.23	1.40	14.31	1.35	0.60	3.29	7.84	0.90	7.71	2.18	3.98	11.75	4.87	0.62	0.79	3.20	2.77	158.8
54	5.24	0.65	11.60	3.57	6.78	9.12	13.68	5.01	5.67	7.66	2.80	1.25	4.11	0.77	2.00	0.18	0.22	2.05	1.85	8.33	139.0
55	9.08	2.59	27.42	8.23	0.26	5.84	12.05	1.70	0.37	3.75	0.76	4.18	1.63	1.15	1.72	0.82	1.15	3.62	0.85	0.03	129.6

#17 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
2	2.42	7.96	2.81	1.44	0.86	5.71	1.85	17.98	22.81	7.47	0.20	1.29	0.18	1.07	4.78	7.26	1.14	0.58	4.00	0.08	92.2
3	3.97	1.16	2.62	2.72	5.31	4.27	6.11	0.51	14.26	7.05	0.60	16.16	3.54	4.34	6.99	1.04	4.40	2.44	3.07	3.25	114.7
4	2.92	1.43	0.06	1.50	6.46	0.53	0.17	2.41	6.89	8.36	0.73	24.30	14.86	3.83	2.44	1.46	0.14	4.46	8.00	2.42	121.8
5	0.69	0.56	0.45	1.03	0.56	0.32	0.47	0.53	0.41	1.85	3.36	0.07	1.50	0.63	1.02	0.81	0.73	2.10	0.36	0.46	150.0
9	3.08	4.67	0.18	0.24	1.12	13.01	19.60	4.04	9.69	5.25	5.51	10.93	7.86	4.99	2.95	0.49	1.29	0.01	0.93	0.39	176.9
10	6.71	2.14	1.24	0.13	2.11	4.54	7.67	6.27	0.32	0.08	2.34	3.80	2.00	0.93	0.54	2.31	1.04	1.06	0.08	0.34	141.5
11	0.68	0.55	0.56	1.63	3.74	1.15	15.97	24.93	0.98	7.97	3.72	12.67	5.10	4.45	0.79	0.39	2.26	1.35	1.54	1.36	151.5
12	3.04	2.62	3.48	0.91	5.61	6.33	3.87	12.52	3.18	1.36	6.07	3.37	9.17	4.82	3.09	0.28	2.43	1.57	0.13	12.37	148.2
13	2.40	6.69	3.51	8.73	5.83	9.25	0.52	4.26	4.87	9.57	3.17	3.11	3.15	2.31	5.47	3.64	0.17	7.77	5.68	2.70	178.0
14	0.89	2.04	0.95	12.33	4.73	7.09	21.46	4.28	1.46	7.25	7.18	6.37	0.48	0.79	9.92	2.45	0.06	4.29	0.81	0.51	152.0
15	5.90	0.67	2.53	14.06	3.83	0.98	9.96	6.68	1.16	7.15	1.00	4.21	4.24	1.10	0.54	5.40	9.17	2.26	6.50	1.56	160.7
16	4.60	1.25	0.37	10.83	5.06	2.46	1.96	15.22	0.86	10.19	2.57	10.57	0.71	0.79	5.20	0.28	3.22	5.90	2.58	0.72	181.0
17	3.32	4.62	0.32	0.70	0.01	3.74	11.48	0.88	0.94	0.53	2.08	1.08	0.77	0.17	0.08	0.82	1.40	0.46	1.35	0.42	169.6
18	2.70	3.53	2.12	3.43	19.29	0.85	13.39	3.20	1.76	10.21	6.15	1.07	1.23	2.78	12.79	2.05	2.09	0.41	3.07	1.60	140.0
19	3.79	6.87	6.11	4.84	0.98	2.70	11.58	6.47	7.00	4.60	21.57	6.54	1.01	0.16	1.25	2.25	0.21	1.38	0.30	5.79	199.1
20	6.59	0.97	0.30	0.47	7.22	16.36	11.24	1.46	5.45	7.80	0.47	0.78	2.14	1.82	0.23	2.15	0.10	1.30	2.08	1.60	211.2
21	2.09	2.56	4.37	0.38	14.19	14.54	9.07	0.55	8.93	1.17	7.75	0.44	4.56	3.43	0.51	10.17	7.81	1.25	1.38	1.10	220.5
26	23.55	7.74	7.28	1.45	2.04	0.08	13.29	2.60	9.52	2.67	1.52	10.07	0.82	1.60	0.86	2.66	4.27	2.41	2.61	0.87	130.2
27	8.29	0.68	1.32	5.18	8.02	16.34	13.00	0.96	0.85	5.27	0.33	2.31	1.13	2.75	0.03	1.46	8.04	1.85	0.51	5.00	72.9
28	5.82	7.28	1.56	1.23	1.64	15.22	18.12	1.26	2.00	6.24	3.74	1.57	4.15	2.67	3.25	5.65	0.05	1.84	2.81	0.44	100.5
31	6.67	4.73	3.14	4.79	20.12	14.91	7.22	5.39	7.72	4.80	10.36	2.15	7.60	2.68	7.41	1.50	0.65	3.88	3.40	0.69	104.5
32	9.90	0.29	0.06	13.61	8.69	0.83	6.78	0.50	6.41	2.75	14.95	5.45	1.03	0.88	0.28	10.03	0.34	1.94	0.94	3.40	117.6
33	5.08	2.60	8.90	8.89	13.93	0.16	8.72	1.67	4.27	5.16	6.28	5.34	4.05	1.98	2.29	3.54	2.47	0.63	3.35	1.28	121.8
34	6.07	4.71	0.74	4.27	13.67	8.60	9.65	0.74	0.04	3.81	8.95	1.03	1.25	0.12	2.89	9.18	3.78	0.90	0.76	0.88	93.4
35	0.26	0.87	1.25	0.40	0.47	0.50	0.45	0.60	0.50	0.48	0.97	0.70	0.14	0.21	0.59	0.17	0.45	0.38	1.52	0.73	189.3
36	9.10	2.30	2.54	8.43	2.03	23.61	22.30	2.10	0.40	1.68	2.90	1.30	0.16	6.47	2.71	1.02	0.24	1.80	1.42	1.02	148.6
37	7.00	18.24	3.30	8.09	11.40	4.39	7.60	1.63	5.71	4.54	0.59	5.84	2.19	0.71	0.91	3.49	1.39	2.60	1.42	2.68	178.9
38	7.43	2.88	2.78	5.99	0.49	4.25	2.77	6.72	1.33	2.15	1.06	7.19	5.10	12.56	7.18	0.61	2.28	1.54	5.78	1.31	177.2
44	26.00	12.71	11.21	0.22	1.19	10.19	7.00	0.19	1.36	0.49	0.34	5.64	0.72	5.67	1.71	4.64	3.06	1.71	0.15	1.49	204.6
45	3.78	2.99	3.41	6.65	4.38	6.32	4.46	9.17	9.76	3.62	2.28	5.17	0.37	9.92	8.29	1.33	2.43	0.19	3.82	3.11	169.3
46	11.23	8.35	9.74	2.71	3.92	20.13	0.50	0.31	0.00	0.59	2.67	13.23	5.06	0.95	1.14	0.21	2.77	1.10	2.36	3.00	133.0
47	22.30	12.42	1.62	8.11	9.56	0.14	4.88	13.60	0.83	3.84	6.12	1.71	0.20	1.54	2.86	1.30	0.59	1.10	0.18	3.33	139.1
52	27.69	5.87	3.78	1.01	0.83	1.59	3.24	6.30	0.83	1.45	3.01	0.06	2.66	2.91	2.28	4.48	2.43	0.84	0.46	3.48	153.4
53	13.63	11.59	0.49	5.93	2.91	0.32	2.19	5.00	0.91	1.61	2.39	0.85	5.71	7.91	4.37	8.99	2.62	0.05	0.84	3.47	107.5
54	5.39	13.90	22.61	4.41	9.21	0.45	1.96	1.18	5.26	1.62	6.02	3.08	3.33	0.93	1.37	3.94	3.40	3.31	1.29	2.28	136.1
55	3.08	0.30	0.62	1.28	5.43	3.82	1.39	5.73	2.18	5.99	5.94	0.18	0.84	1.71	1.37	4.98	4.26	1.55	2.43	0.42	160.3

## #18 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
2	20.12	13.28	6.50	0.21	3.91	5.38	3.71	3.30	3.65	0.85	3.02	1.72	3.41	2.57	0.45	5.38	1.74	2.56	1.88	1.79	54.9
3	38.24	2.72	2.11	1.73	1.07	3.06	5.10	2.62	1.31	2.49	3.86	0.94	1.30	3.99	3.57	9.19	0.58	6.27	0.90	2.53	32.5
4	3.92	7.37	7.84	0.42	0.84	3.05	1.64	2.49	1.41	1.22	1.39	6.69	2.04	0.69	8.21	0.81	2.36	3.68	2.77	5.69	35.5
5	7.87	5.13	2.04	1.98	1.75	2.25	0.82	1.84	1.31	3.61	4.98	1.25	0.76	0.45	0.31	0.89	0.17	1.07	7.17	3.10	52.7
9	4.52	17.06	8.24	2.36	7.57	2.57	1.5E	1.49	0.47	5.72	2.21	8.75	0.16	2.76	3.52	0.98	4.77	3.80	0.47	2.10	25.3
10	10.56	6.05	0.01	8.77	2.19	3.27	14.51	2.16	5.63	2.75	16.99	0.31	1.12	5.91	5.23	1.03	3.63	0.15	2.12	0.04	22.5
11	0.49	8.18	7.20	9.09	10.38	1.17	1.39	1.32	6.23	2.80	2.89	7.15	6.86	7.83	0.09	0.11	7.11	0.68	0.81	0.29	29.2
12	5.22	5.42	0.02	1.13	1.29	18.62	8.32	7.13	0.10	2.72	4.89	6.91	2.65	1.74	0.13	6.74	5.63	2.69	1.11	1.72	37.0
13	0.33	3.59	0.06	3.25	3.66	19.25	0.29	4.53	11.92	2.40	0.60	19.24	3.40	11.12	2.18	1.25	1.60	0.85	1.58	1.75	60.2
14	2.34	4.12	2.58	3.85	3.48	2.22	17.10	5.00	11.81	10.16	3.02	5.83	0.33	2.12	1.16	2.36	3.67	2.35	2.51	1.25	51.8
15	2.60	12.57	1.28	1.93	5.75	6.92	0.95	21.27	2.76	6.35	2.88	2.25	3.34	3.38	1.47	4.96	2.12	2.58	1.68	0.20	27.8
16	13.24	0.31	7.96	3.67	0.72	1.31	6.04	5.16	0.42	17.28	3.86	8.23	1.43	1.40	3.12	3.33	3.01	6.58	0.07	0.21	54.6
17	2.66	2.23	0.23	1.66	2.92	0.43	0.01	3.48	6.70	3.32	3.51	0.77	0.66	1.65	0.12	0.56	0.07	0.41	2.26	1.68	30.7
20	10.27	5.65	2.96	1.58	2.05	9.33	4.67	4.74	2.65	5.03	3.40	4.24	1.64	4.75	1.94	5.89	1.11	2.13	0.63	0.96	52.1
21	2.29	7.16	2.73	6.37	9.89	2.81	16.83	1.54	4.27	0.87	6.35	5.42	3.42	5.87	0.81	5.42	0.58	3.28	2.98	4.16	30.8
26	15.77	0.03	2.01	2.96	0.92	9.93	6.14	1.79	5.50	3.62	5.41	0.62	0.27	0.30	6.50	3.79	0.71	0.46	1.62	7.43	63.3
27	15.46	1.66	12.90	1.35	3.41	13.44	5.36	0.45	1.19	3.63	3.13	6.23	6.88	6.10	1.60	3.16	0.55	0.12	0.50	0.41	42.5
28	18.70	2.46	1.70	3.06	15.41	11.25	1.87	6.45	2.83	3.50	0.19	3.24	5.72	1.25	2.08	2.36	4.60	2.27	0.13	1.09	38.9
29	5.53	8.63	1.04	2.81	11.55	15.55	4.55	3.17	0.86	0.31	9.54	0.55	0.53	6.34	0.03	2.31	10.05	1.28	1.79	2.86	43.8
30	10.52	0.94	4.94	7.78	6.09	7.62	4.83	2.83	7.17	5.15	3.16	2.38	2.84	3.42	7.65	4.32	0.09	2.99	0.27	3.30	38.4
31	10.89	1.11	0.95	1.40	3.25	13.88	1.37	3.72	1.93	0.77	2.02	2.16	4.16	0.00	0.65	0.39	0.42	2.77	5.79	2.96	48.4
32	29.19	3.71	1.96	0.15	13.30	12.92	11.25	2.20	3.91	1.63	0.05	0.87	1.39	1.43	1.70	0.55	0.21	3.22	0.89	0.06	74.4
33	28.41	1.73	1.32	2.96	12.70	4.48	12.25	2.98	1.09	0.66	0.24	0.55	2.55	8.11	1.86	0.37	1.99	2.74	1.49	2.63	80.5
34	9.21	0.13	4.25	11.49	1.86	9.52	11.08	1.13	12.60	1.13	3.81	2.12	5.65	4.47	0.32	6.37	3.11	0.94	0.28	0.09	60.0
36	27.51	1.17	1.35	0.51	0.79	4.76	8.04	5.66	10.29	5.71	2.82	1.74	1.02	4.62	5.76	1.30	0.50	0.08	3.27	2.23	49.8
37	5.95	2.46	2.14	1.49	2.19	10.22	3.55	3.35	4.84	10.07	7.20	2.56	1.35	3.00	10.39	0.62	0.62	6.47	0.87	5.03	57.7
38	17.22	6.35	4.20	3.83	0.37	1.84	0.69	1.83	5.80	1.50	5.67	0.48	10.31	2.17	5.18	0.24	1.99	4.63	1.92	4.56	111.6
44	23.36	0.49	3.23	8.40	11.36	4.96	1.09	3.56	4.93	2.13	2.09	5.08	2.84	1.50	5.32	0.15	0.23	0.12	0.08	1.98	78.4
45	10.90	4.94	21.89	6.13	0.08	2.52	0.83	0.71	5.82	11.67	2.52	1.61	6.71	10.07	1.27	5.45	1.88	1.25	0.05	1.06	40.8
46	33.14	12.03	0.50	1.49	3.75	0.90	5.33	8.35	7.72	7.60	1.29	0.08	1.37	0.18	0.75	0.13	0.39	0.50	0.36	0.23	41.3
47	48.99	18.49	3.44	1.72	3.43	1.60	1.14	1.24	2.70	1.81	1.45	0.92	0.04	0.15	0.86	0.40	0.14	0.06	0.07	1.17	60.4
48	13.08	0.17	0.19	0.48	0.67	0.35	0.08	0.14	1.29	0.04	0.13	0.25	0.17	0.11	0.53	0.34	0.14	0.16	0.52	0.26	94.2
52	42.32	0.11	1.04	0.51	1.77	2.67	1.55	2.22	8.94	3.82	8.32	1.02	0.32	0.34	3.65	5.28	0.15	2.36	0.61	1.43	82.6
53	19.37	15.08	11.45	0.41	9.08	11.80	2.08	1.33	4.98	1.23	6.74	4.79	1.23	1.85	0.43	1.30	0.03	0.94	2.95	1.03	49.8
54	30.22	3.15	0.04	16.48	13.73	1.50	2.02	4.36	0.22	2.96	0.11	5.07	2.13	2.11	4.96	0.43	1.60	3.35	0.33	0.66	61.0
55	50.59	2.16	1.33	14.33	5.99	0.60	3.65	3.51	1.45	0.88	4.34	0.77	1.24	3.62	6.22	0.62	1.46	0.43	2.02	0.99	45.6

## #19 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	25.96	2.96	0.50	2.28	0.38	2.35	1.18	1.09	5.17	19.92	2.64	3.66	3.64	1.24	5.60	2.58	1.91	1.82	3.40	1.09	28.3
4	9.25	2.63	2.51	1.82	10.13	7.97	14.26	1.44	6.81	11.25	0.05	1.94	8.42	4.33	2.98	3.52	1.89	1.33	0.38	0.35	45.6
5	6.91	12.80	10.57	3.26	3.25	1.42	18.01	8.96	1.53	1.91	1.77	0.57	1.15	1.61	8.05	0.21	2.04	0.52	2.08	0.32	54.4
6	2.48	6.45	7.78	0.32	6.04	12.96	7.52	0.06	8.30	5.88	11.31	0.69	6.33	3.99	3.89	0.07	1.08	1.10	3.43	2.38	95.8
7	6.56	0.72	4.96	1.26	3.34	22.14	13.67	4.76	1.70	1.15	3.26	3.06	7.44	8.55	2.03	0.06	0.02	5.87	2.61	0.08	79.6
8	12.58	5.39	2.91	3.87	14.52	21.66	0.86	4.50	2.96	10.63	9.54	0.00	0.62	0.07	1.55	1.24	1.35	0.50	1.36	1.77	82.7
9	8.09	4.70	4.85	1.56	10.11	24.59	5.61	0.45	4.68	1.37	3.62	14.84	0.43	3.83	0.65	1.25	0.32	1.90	1.79	0.24	103.0
12	14.57	3.20	4.68	10.91	8.31	5.30	2.46	1.70	0.32	9.23	0.65	3.45	10.05	0.00	2.04	1.94	4.22	3.57	3.05	0.14	87.2
13	23.70	3.67	0.50	0.66	4.21	12.54	0.41	1.58	0.73	6.33	0.83	2.37	0.08	0.51	0.88	6.66	14.32	1.61	1.53	2.07	102.4
14	2.42	3.37	8.19	1.17	7.20	6.85	1.22	7.58	2.34	1.47	0.52	0.70	6.22	1.39	2.53	2.11	2.64	3.27	8.48	1.90	92.8
18	21.76	5.28	6.93	0.66	0.09	4.24	7.16	4.46	8.42	8.43	1.61	4.85	8.20	3.47	1.90	0.35	0.68	2.13	1.39	0.20	71.1
19	14.43	11.64	2.79	1.14	0.34	23.97	6.25	4.01	0.48	0.06	4.36	2.95	1.22	8.61	0.07	1.89	3.38	0.15	0.10	5.25	69.7
20	15.18	2.01	4.95	3.14	6.91	11.61	8.12	2.12	1.47	5.43	4.46	5.60	1.14	2.10	0.50	1.54	6.64	6.69	2.16	1.75	81.3
21	4.15	16.32	0.03	0.54	1.83	19.36	4.46	2.55	1.48	3.03	1.32	0.19	1.11	0.11	7.75	4.55	0.93	3.69	2.35	1.13	69.4
22	19.77	4.03	0.07	9.20	2.60	2.55	5.84	2.23	1.40	2.82	4.47	0.61	3.72	2.77	10.29	1.62	10.59	6.91	1.08	0.03	68.0
23	24.18	0.25	3.36	1.95	2.01	9.87	3.52	5.95	0.99	1.80	0.76	2.44	2.37	5.82	4.02	0.77	2.73	4.40	5.81	0.31	77.0
24	14.25	4.97	1.02	9.85	6.31	0.81	2.47	1.16	0.37	2.18	5.33	8.63	1.54	0.47	0.42	0.03	0.04	1.87	0.50	3.76	65.6
25	23.74	5.56	10.33	2.63	11.74	5.30	1.01	4.61	1.22	2.56	1.37	1.85	1.98	1.39	6.31	5.78	1.88	2.17	0.97	2.64	68.5
26	11.80	8.35	4.95	6.66	17.27	10.57	2.88	3.32	0.44	5.76	4.89	1.07	1.83	0.99	2.71	5.36	1.22	2.69	0.96	0.78	84.1
27	41.65	4.71	9.81	3.94	1.42	0.66	0.54	0.77	2.58	0.32	0.44	2.97	1.18	11.58	5.25	0.46	0.17	1.09	0.02	0.11	67.6

## #20 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	5.59	1.37	2.46	1.59	0.21	9.93	0.93	0.88	1.52	8.39	10.70	2.96	7.99	1.47	4.40	3.29	3.21	2.47	7.00	1.36	55.6
4	1.28	1.10	0.56	1.46	9.39	1.42	7.92	17.58	5.97	18.08	0.81	0.95	3.62	3.60	1.19	3.60	4.01	5.60	0.55	1.05	119.2
5	1.41	5.88	2.40	10.50	15.39	0.25	3.62	15.68	12.85	5.45	2.31	0.97	3.43	4.26	0.29	2.49	0.18	1.25	2.44	1.22	140.2
6	0.10	1.57	5.40	6.20	1.86	1.74	7.47	5.99	16.55	17.18	0.70	4.70	1.00	4.09	4.26	6.62	0.50	1.61	4.61	0.12	146.3
7	7.30	0.05	0.90	9.86	6.02	3.55	10.29	1.55	4.52	5.55	6.20	1.71	3.77	4.36	0.75	0.56	3.56	1.33	14.47	1.56	189.1
8	9.97	0.12	8.77	4.56	3.07	6.60	1.51	13.94	12.71	9.68	8.59	0.98	3.17	6.33	0.07	0.22	4.17	2.18	0.03	0.28	172.5
9	4.53	4.76	8.25	7.94	4.68	7.05	14.02	8.64	2.75	1.27	3.21	8.12	1.44	6.55	3.78	1.95	2.00	2.30	2.38	0.11	191.7
12	6.78	0.70	1.49	11.06	8.98	0.39	2.89	4.05	0.85	2.65	20.41	3.48	1.70	7.06	0.92	8.38	0.28	1.95	6.85	1.33	187.7
13	7.13	1.58	14.19	1.46	0.47	5.65	8.52	5.02	5.86	5.33	0.11	1.14	0.93	1.79	10.41	1.34	1.76	13.26	1.74	0.64	189.5
14	9.09	3.36	4.27	4.55	2.04	6.73	1.14	7.19	3.06	1.46	0.83	4.80	4.20	11.78	2.81	1.73	0.78	0.21	2.85	0.34	154.9
18	9.22	2.97	2.83	4.84	6.34	13.85	7.64	3.76	7.92	14.26	1.40	2.33	1.69	5.33	2.61	0.12	5.41	0.98	2.26	0.77	146.2
19	19.19	0.10	4.94	11.62	6.03	1.50	13.08	0.04	6.88	10.44	0.13	0.06	2.69	1.14	2.73	4.49	6.68	1.67	1.81	0.13	138.1
21	10.66	0.86	1.29	0.34	7.41	11.78	10.44	4.19	11.65	1.77	9.13	2.03	0.02	5.81	3.62	0.09	1.59	1.97	1.32	8.36	104.6
22	13.64	7.90	4.07	5.40	6.44	4.88	9.35	11.45	6.98	4.69	11.06	2.15	0.60	0.12	0.40	0.64	0.30	0.53	0.22	1.49	144.9
23	26.72	4.02	0.10	6.35	4.03	10.15	3.90	5.48	0.58	4.03	3.79	3.87	5.05	7.96	0.11	0.66	0.77	2.64	1.50	1.85	132.2
24	9.68	0.88	2.36	2.87	3.85	0.10	4.16	4.20	1.78	0.29	5.34	0.17	1.07	0.05	0.28	2.06	0.61	6.15	0.39	0.71	161.3
25	31.47	0.73	1.59	0.12	1.95	3.37	1.59	0.78	1.68	1.61	9.10	6.16	5.50	6.95	16.27	1.13	0.22	0.60	0.24	0.06	182.3
26	29.97	2.99	4.46	0.26	4.64	6.75	3.55	0.51	0.38	2.05	12.06	1.58	3.56	2.07	9.31	6.26	0.18	0.93	2.68	2.63	168.7
27	23.03	1.06	2.19	5.99	6.39	5.07	20.73	0.58	0.02	0.20	2.05	2.41	0.86	9.98	1.07	0.58	1.93	2.39	3.00	1.15	155.8



## #21 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	2.43	14.96	6.10	3.99	4.19	7.12	2.34	13.91	6.13	1.81	0.58	3.31	5.04	4.91	4.94	4.66	3.90	0.42	1.09	2.31	22.3
4	3.88	10.50	0.73	2.90	0.23	1.36	3.03	2.61	15.11	11.15	5.98	0.56	0.90	0.26	0.47	1.89	0.60	8.00	5.54	6.55	50.1
5	2.46	6.35	1.49	4.81	1.85	0.44	27.62	4.79	9.31	0.46	3.43	1.71	1.95	2.04	6.58	5.03	4.37	1.32	0.26	7.34	42.7
6	0.89	3.41	9.54	1.94	26.81	2.96	1.30	3.00	7.53	8.92	5.81	2.53	4.93	4.04	5.87	2.31	0.23	0.56	2.51	1.31	65.2
7	7.60	2.08	2.46	3.35	22.35	4.68	0.92	7.18	2.78	0.12	0.03	0.90	16.63	1.23	2.17	0.83	0.82	4.40	1.12	0.05	61.5
8	18.96	2.62	2.66	4.26	2.68	1.45	0.29	9.90	10.50	0.22	10.11	5.55	7.62	4.47	1.54	0.08	0.04	0.82	5.11	3.07	58.0
9	2.65	1.17	2.70	3.27	10.69	2.43	4.86	17.24	3.45	4.36	1.33	5.34	4.69	0.34	0.89	9.00	4.13	5.22	0.32	2.97	25.4
12	2.20	3.19	2.68	3.44	5.50	4.29	7.68	2.06	14.66	9.12	0.51	2.94	5.90	2.66	0.97	0.41	0.97	2.95	11.70	0.21	92.0
13	11.69	12.71	1.77	3.84	0.15	0.96	20.87	3.92	7.11	8.40	0.43	1.96	0.21	0.07	0.76	1.97	1.55	1.96	1.68	1.94	143.6
14	1.54	1.34	2.56	3.77	4.46	7.76	2.27	2.86	2.72	4.68	3.85	0.45	3.39	2.29	0.60	0.90	0.16	2.55	1.95	0.79	154.9
19	35.00	1.06	0.60	1.22	2.90	9.26	4.31	0.18	0.98	0.60	0.49	1.61	9.05	2.57	0.80	0.77	0.57	4.10	2.12	0.74	192.0
20	6.18	7.29	4.93	6.86	2.14	17.29	1.37	0.20	17.27	1.41	4.01	1.78	4.80	2.63	2.82	0.67	1.54	0.05	0.11	4.18	159.7
21	6.80	8.08	0.33	10.09	4.24	15.95	18.48	0.98	5.61	5.51	3.94	2.39	1.51	5.12	0.21	1.54	1.43	0.31	1.89	1.86	161.1
22	6.00	4.70	1.16	5.84	2.78	16.75	2.56	4.46	0.58	4.44	2.67	0.64	8.59	3.63	5.12	3.55	2.59	1.81	0.40	1.81	158.8
23	11.87	7.75	1.48	0.73	10.49	12.03	3.94	1.48	4.91	1.89	1.19	5.22	2.35	7.58	0.02	3.18	1.40	1.80	6.15	3.99	156.2
24	9.48	6.61	2.77	2.92	1.21	2.03	14.26	6.73	8.43	3.67	8.68	0.50	1.64	0.43	0.23	1.17	3.38	13.49	0.79	0.49	158.7
25	57.10	20.64	4.59	0.99	6.18	2.30	1.40	0.13	4.22	2.18	3.29	2.91	7.66	6.13	1.69	5.90	3.54	12.67	16.36	10.78	165.1
26	8.46	8.16	1.79	3.08	12.25	0.39	15.07	3.62	2.14	2.45	14.27	8.76	0.33	2.08	1.93	2.98	3.01	2.86	1.61	2.42	179.2
27	14.86	2.98	0.70	4.45	10.57	17.53	2.35	3.34	2.29	0.71	3.63	0.57	2.73	3.39	1.23	0.83	0.96	0.30	3.83	5.18	134.9
28	17.79	9.97	2.08	13.07	5.98	0.95	1.84	13.56	2.46	0.58	0.82	4.77	1.06	5.68	5.71	0.69	0.39	0.51	0.53	1.88	144.8

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	2.75	0.09	4.88	0.19	6.90	2.85	0.54	2.55	1.67	10.82	2.21	4.22	4.61	4.45	4.06	2.75	4.87	0.85	5.78	0.46	53.0
4	8.50	0.38	0.98	0.17	15.86	13.09	1.31	9.82	2.38	0.42	6.18	8.95	3.44	0.79	0.54	3.10	8.35	1.04	2.75	1.69	48.6
5	1.76	1.51	1.01	0.56	20.91	20.24	1.22	0.32	3.46	2.44	15.52	4.63	0.31	1.14	0.25	2.66	9.12	1.53	0.68	0.55	42.8
6	5.94	2.28	5.57	3.70	1.61	1.52	39.72	9.96	3.79	0.45	2.81	0.90	2.99	3.85	7.27	0.38	1.40	1.03	0.14	2.00	104.3
7	2.31	2.10	1.57	3.92	4.19	1.17	13.06	15.73	1.37	7.63	3.54	0.49	1.22	0.01	1.33	0.34	0.56	6.34	4.53	1.44	124.6
8	7.19	5.86	1.10	1.42	3.54	2.00	21.10	5.52	1.27	8.46	6.53	3.61	3.09	9.77	5.52	0.10	1.50	0.70	0.47	1.07	169.6
9	5.99	1.44	0.82	1.61	15.78	10.18	1.80	2.55	10.77	17.21	7.99	0.75	2.28	3.68	2.85	2.51	0.07	0.80	0.26	0.97	164.5
12	8.01	5.77	5.81	1.71	0.51	20.45	4.59	7.86	4.10	0.82	6.38	8.68	2.97	5.02	1.07	1.94	0.18	2.01	2.17	1.91	141.5
13	0.45	5.61	1.11	6.53	5.94	6.17	35.22	1.01	3.90	1.35	3.31	11.59	3.25	1.12	0.89	0.26	0.14	0.89	4.53	0.65	157.5
14	1.31	7.30	5.80	4.70	2.83	24.27	9.38	0.15	11.06	3.35	15.58	0.20	6.42	2.17	3.79	5.76	3.74	4.88	1.30	1.76	164.6
18	4.51	5.63	0.84	4.55	2.40	11.12	10.72	10.18	7.92	0.35	2.77	1.72	8.09	0.93	0.44	2.08	0.21	0.41	3.45	3.11	73.3
19	2.27	1.91	4.29	10.28	34.50	5.42	2.40	5.68	1.38	3.97	1.13	0.32	3.55	0.00	0.56	2.29	0.72	1.12	2.71	2.03	96.9
20	8.79	6.61	1.83	0.91	12.59	7.36	16.29	2.08	3.81	0.31	7.90	0.25	0.69	1.72	1.21	1.92	1.41	1.19	2.95	1.04	112.3
21	27.04	0.33	0.99	5.84	5.60	15.32	12.08	5.67	4.23	4.05	0.83	1.36	0.32	3.67	9.74	1.78	2.63	1.19	1.97	0.06	116.4
22	28.28	5.61	3.96	8.12	7.77	0.36	3.36	1.84	8.65	6.52	0.58	0.34	3.18	7.37	1.54	0.47	1.86	0.92	4.21	1.38	131.8
23	18.87	4.16	0.05	3.15	13.83	12.49	24.05	0.53	0.47	0.07	0.63	6.86	4.33	2.30	2.00	2.43	0.19	0.47	0.86	0.20	113.2
24	3.56	1.24	0.40	5.91	4.99	3.14	2.61	0.88	0.28	0.77	1.00	0.73	1.33	0.01	0.94	0.51	0.08	0.78	0.66	0.66	107.6
25	25.84	2.84	8.55	13.80	0.39	0.90	9.34	0.66	1.84	1.53	12.13	0.69	0.92	0.32	3.09	0.49	0.09	0.74	1.44	1.31	123.2
26	24.20	1.40	6.18	0.09	4.79	1.59	1.14	1.02	1.98	1.10	9.19	0.11	2.78	13.06	0.44	6.48	2.97	2.79	2.31	1.06	104.9
27	28.44	13.13	18.45	2.33	1.53	7.84	1.57	1.83	3.69	0.11	1.82	0.84	0.18	0.48	2.00	0.74	1.73	1.25	2.26	3.79	152.2

## #23 (M)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	8.00	1.32	1.84	3.51	3.76	0.03	1.54	2.76	11.77	14.17	8.04	2.19	6.39	1.53	5.43	2.95	2.79	0.66	0.29	3.50	30.8
4	4.45	1.70	1.89	5.91	1.48	1.07	11.28	4.71	2.02	9.06	23.77	0.73	0.74	2.61	2.73	3.13	1.11	8.09	0.88	0.95	49.0
5	1.06	6.00	7.82	8.22	7.58	16.47	0.73	4.55	0.35	2.87	10.39	6.01	8.32	0.10	1.52	6.57	1.43	1.08	2.72	1.61	82.4
6	2.29	11.63	11.98	14.57	2.89	0.12	8.74	20.37	1.11	0.59	5.14	6.47	2.31	4.07	0.93	2.83	0.49	0.54	0.13	0.93	108.6
7	9.01	5.41	3.61	6.48	18.12	4.64	8.50	0.89	2.57	2.47	0.45	5.16	0.86	1.99	3.05	1.10	1.51	0.10	5.46	3.74	125.0
8	3.68	3.75	1.61	2.69	5.71	8.96	1.60	35.00	2.29	1.61	1.04	0.24	2.44	2.72	1.67	4.84	3.07	4.70	0.88	0.95	107.9
9	12.31	12.10	3.84	5.29	4.51	8.66	1.78	4.86	1.80	0.12	0.70	6.53	9.71	0.47	1.60	3.72	7.20	0.51	1.92	1.74	99.4
12	7.10	3.93	3.25	14.10	0.94	13.66	13.37	1.38	2.43	3.96	2.21	1.04	10.04	0.69	0.13	0.46	3.94	1.01	1.33	0.79	52.6
13	0.94	6.64	4.81	14.92	15.51	5.21	0.65	4.51	3.94	4.17	9.93	7.08	1.03	3.50	0.77	2.39	1.81	2.32	0.70	1.00	111.2
14	7.87	2.75	1.18	6.92	1.69	1.69	0.70	1.37	2.03	0.19	3.73	3.51	0.30	1.23	1.35	2.61	0.30	0.79	2.26	0.40	132.3
18	1.59	5.95	8.02	0.61	3.31	11.79	3.99	0.76	14.45	6.69	3.70	5.64	6.21	5.16	1.83	5.60	2.42	1.61	3.56	0.10	198.5
19	4.17	10.26	7.83	4.22	1.15	0.83	14.07	3.54	1.81	6.17	2.43	6.77	14.12	1.23	9.60	2.13	0.23	2.83	0.03	0.87	190.6
20	1.83	2.61	0.44	6.80	2.44	7.11	1.39	6.73	16.18	3.05	0.48	0.09	0.15	14.29	5.47	0.91	10.74	1.40	4.08	2.73	208.4
21	4.42	2.86	3.38	15.10	10.00	2.06	4.75	0.98	2.77	0.31	7.60	2.16	0.47	4.64	3.30	1.05	2.43	2.78	0.71	4.35	186.0
22	3.90	1.95	3.94	13.80	1.93	18.53	1.22	1.12	17.14	8.02	2.89	0.54	3.76	4.45	0.91	0.89	0.15	3.79	2.82	2.90	156.4
23	5.09	15.47	16.38	1.36	12.24	13.65	4.23	0.08	0.24	2.45	4.69	4.76	0.59	0.58	3.58	0.25	0.09	1.15	1.45	1.68	178.1
24	1.11	9.47	3.40	4.81	1.41	6.31	2.50	10.05	2.54	0.40	1.72	4.22	3.38	1.48	2.08	1.71	3.01	4.58	3.92	0.30	174.5
25	12.00	3.61	9.42	12.41	3.21	6.82	5.06	2.50	7.28	3.11	0.00	7.40	2.22	2.08	3.68	1.45	2.00	1.57	1.13	1.97	199.8
26	5.01	1.52	1.44	11.40	2.82	23.15	1.93	0.24	16.95	2.06	4.10	0.40	6.67	3.77	1.04	1.99	2.91	2.05	1.38	0.78	200.6
27	16.86	4.73	1.47	1.03	15.88	0.84	1.09	6.38	1.49	10.78	4.19	11.76	1.84	0.34	0.21	0.97	2.85	5.31	0.74	4.45	183.7



## #25 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	9.28	8.87	1.16	1.13	2.25	5.45	5.22	5.08	3.61	13.57	0.69	9.20	3.00	7.47	0.27	2.57	1.32	1.87	1.81	4.64	99.4
2	5.10	1.07	0.43	4.29	3.51	6.27	7.52	2.01	12.07	4.94	1.03	8.06	16.78	4.32	3.57	0.72	1.73	1.85	6.31	0.53	80.1
3	1.27	1.24	2.64	4.68	2.34	1.26	9.39	9.99	14.14	5.87	3.89	2.30	9.32	0.17	4.16	0.65	7.52	5.74	2.02	1.88	94.1
4	0.67	1.93	6.52	2.64	4.06	2.97	2.39	5.57	1.46	3.66	2.03	2.45	2.49	1.43	9.77	1.42	3.13	0.39	1.74	0.02	91.4
5	1.95	0.77	1.19	13.24	6.91	11.68	6.88	1.60	0.38	3.84	24.02	2.08	1.96	0.54	1.86	0.80	0.19	3.91	3.58	5.27	124.8
6	0.18	7.99	0.38	12.32	5.40	6.49	6.61	18.69	1.94	0.56	5.32	5.93	14.54	0.32	2.13	0.74	1.37	0.54	2.42	0.68	117.5
9	1.45	2.68	3.46	6.85	0.29	6.64	24.18	11.47	2.59	0.69	2.32	0.16	14.51	0.46	4.26	1.58	2.61	2.55	0.37	7.28	124.9
10	0.38	5.20	0.93	2.37	3.39	7.61	5.92	10.20	6.36	19.17	0.11	0.48	1.05	0.93	0.07	6.92	1.91	8.92	3.06	2.77	83.0
11	13.84	3.78	8.59	17.70	1.56	12.24	11.34	2.81	15.74	9.85	0.42	0.10	17.79	2.69	0.30	1.12	8.59	3.86	0.15	1.25	55.2
12	1.88	0.87	6.54	15.87	9.62	14.81	6.49	2.05	6.33	6.19	1.61	4.00	0.84	2.24	4.62	1.19	5.07	2.58	0.77	0.44	83.2
13	0.09	1.45	3.25	8.69	5.53	2.81	14.45	2.85	13.37	4.10	3.60	0.76	4.76	3.45	5.11	1.44	2.82	4.95	0.05	5.04	83.7
22	21.03	2.51	14.61	4.49	3.08	0.69	14.42	0.15	11.59	0.66	0.02	1.06	8.61	5.35	1.00	0.04	0.59	0.01	0.14	1.07	113.7
23	36.24	8.18	2.06	7.33	2.59	0.07	0.97	0.25	7.15	3.08	5.18	3.62	1.60	3.54	0.77	3.35	0.61	3.19	2.85	2.48	125.2
32	7.25	2.01	7.96	3.45	15.65	3.85	1.72	2.52	9.35	0.64	1.61	2.43	3.04	5.25	0.46	4.20	2.31	2.39	0.44	2.97	59.5
33	2.44	0.95	14.37	7.82	13.72	0.79	12.98	3.76	1.30	6.89	3.28	1.16	3.65	12.66	1.77	1.30	0.64	0.61	0.82	1.58	61.7
34	1.71	11.46	1.75	7.01	8.23	4.10	2.34	9.52	8.25	3.19	0.34	0.06	2.66	8.39	0.76	5.91	4.65	8.58	0.77	3.44	45.1
35	6.42	1.75	8.27	4.57	0.77	2.22	5.90	2.14	6.70	0.49	0.35	3.47	1.19	0.48	1.26	0.17	0.41	2.47	0.29	0.74	76.2
36	25.47	3.20	5.73	0.88	1.16	3.80	5.32	15.50	1.40	1.40	6.66	5.99	0.36	6.02	0.38	1.03	5.40	0.21	1.02	1.37	105.6
37	23.32	0.37	9.82	3.63	11.74	7.81	2.61	0.68	1.42	5.23	6.35	1.95	4.23	0.66	0.32	0.73	7.02	0.14	2.02	6.59	89.3
38	11.30	3.08	3.07	24.98	15.96	8.57	0.15	0.21	3.72	4.13	10.17	0.23	2.98	2.32	3.58	1.60	0.84	1.47	0.28	0.01	76.5
39	14.94	0.49	10.68	0.26	8.50	0.96	0.25	6.12	10.52	8.20	3.47	4.09	2.40	6.93	3.25	1.50	2.80	1.28	1.60	0.14	103.9
40	5.93	2.71	0.04	1.55	3.90	11.27	0.63	7.86	19.15	6.49	1.74	0.72	0.13	4.90	2.38	3.17	1.31	2.12	7.93	0.81	107.2

## #26 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	5.08	0.62	2.90	4.19	3.40	1.47	3.92	2.66	8.21	6.87	7.62	5.25	7.71	0.76	4.39	0.01	1.82	4.73	7.60	3.62	37.7
2	1.39	8.63	5.04	7.98	5.63	11.80	6.05	0.16	4.03	13.15	2.23	2.27	2.98	2.78	1.37	5.27	0.49	0.56	1.02	4.91	37.9
3	1.23	8.93	3.47	6.21	2.32	2.11	18.77	18.96	7.26	4.05	0.20	2.92	0.81	3.27	3.08	0.24	7.03	2.02	0.82	0.43	40.6
4	1.43	1.58	4.72	3.35	4.43	8.44	6.30	0.33	1.41	1.56	4.00	0.92	2.19	2.30	1.47	0.92	0.77	1.59	1.47	0.06	64.2
5	7.38	1.86	5.01	5.16	6.94	2.44	1.37	23.27	3.45	5.16	5.75	7.63	3.86	2.70	1.26	1.28	0.90	1.58	3.09	4.09	78.9
6	6.29	4.48	1.47	0.59	5.73	2.96	1.11	4.05	14.12	17.21	0.81	0.26	7.05	4.65	1.34	3.51	3.01	4.35	0.83	0.33	69.3
8	20.27	3.80	6.08	2.88	7.42	7.74	2.42	3.90	0.09	1.99	0.46	9.24	6.36	7.36	3.21	1.17	0.96	4.92	3.94	0.38	75.9
9	15.44	2.10	6.19	0.61	9.27	6.25	1.49	7.92	0.79	2.69	3.32	0.19	4.52	8.01	1.03	1.33	0.57	0.23	9.90	7.01	77.6
10	13.96	7.89	8.26	1.95	0.62	8.74	0.68	4.39	0.23	1.27	2.29	9.43	0.58	1.68	9.49	12.08	4.09	0.72	4.95	2.88	75.9
11	16.44	1.25	6.77	1.86	8.11	2.89	4.84	6.07	3.19	3.33	1.29	11.71	2.45	5.72	2.10	0.10	1.93	1.63	1.86	1.97	86.6
12	25.99	5.11	8.75	2.08	0.11	2.31	3.52	0.29	2.20	8.78	16.06	4.96	2.80	6.63	2.87	1.57	0.59	0.30	0.81	0.19	85.7
13	9.48	4.31	5.57	6.67	1.66	3.32	1.69	11.94	3.52	0.71	7.19	4.91	0.76	8.27	3.80	7.93	1.91	1.53	8.07	1.89	71.8
22	7.47	11.21	2.21	1.67	9.57	1.24	0.04	7.86	8.31	10.61	0.57	1.15	2.69	1.14	8.36	0.84	4.50	6.09	1.93	1.64	69.5
23	30.97	0.82	3.82	1.59	7.96	0.93	2.10	2.25	4.51	11.44	7.54	1.73	0.38	0.16	2.26	0.29	5.13	3.53	2.38	3.50	57.9

## #27 (M)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	6.18	2.09	0.70	5.90	4.47	2.12	2.22	10.91	7.82	4.41	7.15	7.82	5.56	9.44	0.88	2.53	3.23	0.88	3.33	0.74	136.4
2	0.43	1.01	0.19	0.74	3.22	3.31	5.31	24.88	5.13	5.07	13.77	3.41	1.81	0.38	5.46	12.84	1.22	6.12	0.17	0.93	116.6
3	0.05	0.05	1.91	6.02	4.88	4.66	4.88	32.51	7.92	3.68	6.39	6.70	1.26	0.38	0.32	2.81	6.53	2.93	1.60	0.77	155.9
5	2.14	1.18	3.67	0.20	4.79	6.18	3.11	22.52	21.37	6.45	3.88	1.51	2.94	0.71	5.67	2.91	4.22	1.63	0.61	0.41	177.3
6	4.94	0.11	1.09	0.61	4.34	13.65	14.24	18.21	8.89	5.15	1.40	3.29	5.18	1.79	2.09	0.80	1.34	0.76	0.82	4.26	132.9
8	6.60	0.26	0.64	21.31	14.32	2.34	4.81	5.41	8.75	2.29	0.44	7.14	3.35	0.93	0.75	3.22	1.25	3.31	1.31	1.33	175.8
9	0.98	0.49	1.14	6.81	0.57	0.34	11.90	4.60	12.03	2.25	10.18	8.33	2.62	3.90	0.97	2.84	1.23	4.44	4.72	6.60	143.2
11	12.89	1.66	2.46	7.43	7.85	3.78	3.30	3.94	15.46	6.10	4.40	4.49	1.50	0.33	0.92	0.14	0.03	1.39	0.27	9.48	154.5
12	23.17	1.16	4.99	5.58	10.50	1.14	16.40	1.80	3.31	11.13	1.03	3.76	0.78	0.38	0.81	0.96	0.07	0.95	0.42	4.09	154.4
13	22.04	8.77	9.04	7.15	19.64	3.26	0.49	8.01	3.34	0.74	2.07	0.81	2.63	0.02	0.19	0.83	1.59	1.45	1.26	2.06	175.0
22	14.67	3.49	7.06	1.88	2.09	12.18	4.96	4.44	4.61	18.47	7.42	1.05	0.38	0.05	4.23	1.17	2.08	0.52	0.18	0.99	188.2
23	16.39	0.41	1.63	4.19	5.53	25.80	8.91	1.21	1.85	0.85	1.57	3.49	2.93	0.16	1.23	0.14	1.94	7.58	1.41	1.71	204.8
32	14.20	1.24	5.20	0.85	2.39	6.64	10.40	14.12	0.96	13.32	4.93	5.93	6.71	1.06	2.98	1.88	1.17	0.40	1.26	1.20	123.4
33	14.75	3.06	0.31	10.20	1.24	25.38	0.11	1.35	2.48	7.01	5.05	4.72	0.64	1.89	1.86	2.25	1.48	1.91	6.74	3.39	138.9
34	10.96	1.02	9.51	11.78	1.33	14.28	6.23	6.12	1.18	6.25	3.37	2.70	11.84	1.92	0.59	1.33	2.50	0.30	2.24	2.87	131.2
35	19.83	0.71	1.96	0.23	17.89	2.63	3.62	2.92	3.81	0.56	3.54	0.02	0.57	1.03	0.52	0.22	1.22	1.07	0.21	1.58	129.8
36	30.27	4.64	0.87	9.68	5.02	0.79	19.42	0.25	5.09	1.51	0.21	5.21	0.91	0.97	1.49	2.65	1.20	3.16	3.98	1.26	150.2
37	12.93	11.43	3.29	6.84	8.08	7.70	1.69	11.63	1.96	4.59	4.52	4.24	7.50	2.95	1.69	0.78	3.21	0.95	0.49	1.82	139.6
38	21.86	7.16	7.03	2.70	1.12	12.19	5.43	4.56	5.17	1.67	2.25	0.16	3.25	2.86	3.25	2.62	3.55	1.70	1.74	1.01	135.2
39	35.22	2.06	1.85	6.74	2.64	1.02	0.31	3.93	8.12	0.58	1.90	7.52	2.75	1.24	2.33	3.56	2.60	3.14	1.01	0.58	147.0
40	5.63	1.42	6.48	0.46	2.02	4.46	17.62	7.70	11.43	3.71	2.43	3.35	1.09	2.48	1.87	2.32	4.13	4.30	1.68	0.83	145.3

## #28 (M)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
1	4.91	0.45	0.50	0.20	3.39	4.62	1.23	1.10	7.67	14.42	12.48	21.15	2.67	0.34	2.59	1.59	1.62	0.88	2.54	1.84	140.5
2	0.34	3.25	1.76	7.87	9.11	7.25	0.95	13.51	6.72	17.91	4.98	4.38	0.53	2.49	3.98	6.15	5.34	1.90	2.83	0.76	157.2
3	5.07	0.19	2.25	0.45	2.38	0.57	21.31	10.84	6.02	9.59	0.52	8.82	1.58	0.35	8.99	1.66	3.36	4.44	0.35	0.99	139.7
4	1.59	0.03	0.06	0.93	3.57	5.53	0.83	2.03	22.22	2.34	1.70	2.05	3.90	6.91	1.59	2.81	2.55	0.04	2.61	1.03	170.4
5	4.44	0.98	1.44	6.37	1.68	0.75	9.34	6.86	23.15	1.06	1.95	5.75	4.71	1.74	2.06	2.51	0.10	9.03	3.60	0.87	228.6
6	4.46	0.13	8.01	12.96	1.56	5.08	15.80	6.94	8.36	2.49	1.12	3.58	3.66	3.71	2.33	2.15	0.03	3.02	1.66	1.96	216.8
8	13.49	5.92	0.79	3.35	3.42	2.78	13.49	0.17	12.74	8.99	0.50	14.74	3.27	0.74	0.42	6.31	1.96	0.48	0.46	0.56	219.1
9	6.27	1.12	0.33	0.19	11.85	23.60	7.11	2.37	0.92	6.34	10.35	7.78	2.98	2.89	1.37	0.36	1.14	3.46	1.33	2.51	175.1
10	2.90	4.99	0.51	1.53	3.36	0.26	8.06	29.62	1.53	1.16	4.86	14.32	4.90	1.54	0.68	2.18	2.04	3.10	3.20	4.03	144.6
11	2.11	7.19	0.76	9.48	8.47	0.48	2.89	9.32	0.16	3.77	2.20	4.17	1.77	1.88	2.52	1.11	1.82	5.55	2.19	1.78	165.8
12	2.33	4.26	0.70	0.28	6.56	14.17	15.84	8.20	5.38	7.19	3.61	2.18	2.40	4.51	0.69	0.40	3.72	6.14	2.75	1.07	140.3
13	1.68	0.37	2.41	11.65	6.58	9.11	15.17	1.05	3.50	0.64	17.30	3.14	5.67	1.28	1.43	1.05	1.29	0.01	8.71	2.10	178.6
22	17.05	1.06	2.65	7.94	8.53	1.85	2.33	0.02	5.03	10.23	4.58	0.04	0.11	6.71	0.05	2.84	2.02	3.91	13.45	5.40	150.4
23	1.39	16.27	1.48	1.23	8.50	12.29	6.26	1.83	1.88	1.54	8.87	9.22	3.35	0.28	0.06	2.52	5.20	3.14	1.03	1.09	151.1
32	17.62	5.78	1.70	1.81	4.19	6.36	8.06	2.62	3.41	1.67	0.82	3.19	8.06	3.34	1.77	7.50	4.07	0.06	0.31	1.81	65.4
33	14.47	3.10	3.38	24.42	3.87	3.31	0.95	2.04	0.65	1.10	0.21	6.07	10.30	0.39	0.97	4.40	1.24	1.03	3.77	3.52	126.6
34	21.66	1.09	2.38	4.08	1.45	2.29	0.14	4.68	3.71	7.87	3.20	1.62	8.87	1.75	1.22	1.96	12.58	0.42	2.45	2.75	119.2
35	1.08	3.96	8.40	0.33	6.99	0.76	3.81	0.12	2.83	0.74	0.20	0.62	0.09	1.69	0.43	2.40	4.91	0.37	3.77	1.40	101.7
36	28.97	7.37	4.53	0.60	1.39	2.15	13.68	4.46	5.24	1.92	4.27	3.60	9.96	1.60	1.51	3.41	1.85	1.11	0.49	1.19	125.0
37	20.31	6.88	11.16	4.58	7.55	5.65	6.09	1.84	2.71	3.23	3.03	0.53	4.78	2.32	1.22	2.18	4.57	0.42	1.88	0.13	141.4
38	38.32	0.26	1.50	1.28	1.48	1.10	4.39	4.73	2.61	1.84	5.43	2.15	9.27	5.04	2.37	1.34	0.49	0.09	1.82	0.90	192.2
39	13.61	4.32	5.56	6.48	2.36	14.71	3.02	3.47	4.26	2.22	7.13	3.58	1.26	2.87	4.60	0.68	0.44	4.71	5.43	0.94	156.8
40	14.06	9.19	0.41	1.18	10.35	8.56	2.26	2.12	18.60	3.08	6.78	0.52	1.36	9.58	0.24	1.32	0.60	1.51	0.43	1.69	158.5



#29 (F)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
29	23.86	0.14	3.52	0.45	2.01	4.56	7.90	0.65	4.43	17.04	1.29	1.35	1.69	3.11	5.55	1.85	4.64	0.26	5.57	1.10	104.19
30	10.73	5.84	10.97	0.33	9.09	5.94	2.21	16.36	3.68	3.54	14.58	1.30	0.68	0.15	0.37	1.94	0.42	2.35	0.67	1.26	96.49
31	3.57	17.90	5.15	12.05	10.51	0.04	0.80	9.13	2.04	4.07	1.63	5.73	8.57	3.22	1.96	3.62	1.77	0.06	0.93	1.67	35.41
32	12.50	9.08	6.88	3.49	8.11	10.12	1.27	5.80	0.76	1.88	2.86	2.05	1.56	3.38	3.12	1.36	2.58	2.82	1.97	6.64	129.39
34	13.72	9.55	7.02	5.91	2.96	1.93	5.88	11.44	0.08	11.61	3.33	2.64	4.21	2.83	5.40	0.05	0.56	0.62	2.97	0.19	156.41
35	20.48	0.64	2.71	0.21	4.64	3.19	4.42	1.95	13.00	2.44	10.12	6.26	0.25	1.53	5.72	1.64	0.83	4.24	0.55	0.21	176.76
36	15.66	1.00	5.74	4.07	9.99	3.21	0.58	2.35	2.28	12.70	4.69	3.79	8.13	7.81	6.29	2.08	3.23	1.79	0.98	0.02	193.21
37	23.96	8.62	0.52	0.45	2.62	5.78	4.81	0.32	5.20	8.91	6.27	5.07	3.33	2.67	0.93	5.22	7.13	0.91	0.49	0.81	184.37
38	10.75	11.79	7.97	0.32	2.03	0.12	12.25	1.49	2.59	0.97	4.16	7.90	7.53	7.13	1.39	10.51	3.80	0.65	0.33	1.67	182.49
39	5.71	3.90	0.99	0.88	6.91	3.76	11.82	4.21	2.06	5.30	3.71	2.41	2.46	3.14	0.13	1.06	0.26	0.31	0.79	0.06	199.73
43	12.95	2.82	15.39	8.73	6.84	0.02	0.18	5.23	4.95	1.48	0.93	0.20	7.71	6.92	3.30	0.25	0.28	3.30	1.13	0.72	156.76
44	13.85	0.68	5.74	4.82	28.40	2.13	5.31	5.63	0.88	7.92	6.51	0.31	1.16	0.23	0.55	3.26	0.34	1.22	1.95	2.00	183.00



#31 (M)

DIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	A.M.
29	27.25	4.61	7.17	7.19	2.05	0.52	10.92	4.57	2.75	0.80	1.32	3.95	2.92	0.55	1.13	3.37	2.94	3.43	0.34	2.02	28.58
30	23.74	1.83	1.22	2.72	9.14	9.87	1.83	5.84	0.24	2.18	13.57	1.13	1.20	2.96	2.05	0.08	1.90	5.08	0.24	0.71	37.21
31	11.09	0.52	1.43	17.04	1.74	3.30	9.80	0.69	13.15	2.87	8.21	1.56	10.84	4.08	3.15	1.29	0.09	1.22	0.99	1.06	47.82
32	17.32	8.03	17.82	2.34	3.70	0.40	0.91	0.53	6.40	3.87	3.72	4.93	1.88	8.24	3.72	1.42	2.56	1.44	2.30	0.49	38.11
34	37.42	2.61	3.07	2.78	2.42	5.75	2.46	0.31	0.41	0.44	0.83	2.73	5.21	7.79	9.86	6.85	0.03	0.87	1.51	0.76	67.39
35	31.44	0.38	2.19	1.60	6.18	6.51	2.08	0.75	1.22	4.18	7.34	1.36	0.32	3.40	7.22	2.68	0.44	1.62	3.99	3.59	74.60
36	27.25	0.91	0.37	8.76	18.36	0.45	0.17	5.98	1.40	5.46	4.03	0.62	5.38	0.03	3.63	5.63	0.54	1.17	4.50	0.44	93.29
37	25.73	0.21	3.47	4.16	10.53	5.68	3.12	0.77	5.13	5.73	4.56	0.73	2.75	1.93	1.45	0.86	3.74	1.48	0.88	3.60	116.25
38	41.12	2.10	3.95	3.80	1.07	0.31	0.19	0.79	7.23	0.56	8.97	1.30	3.04	4.28	0.13	4.75	1.59	3.42	1.25	3.05	116.88
39	26.47	9.80	19.70	4.90	16.20	1.56	4.67	3.22	5.09	13.09	1.20	1.27	3.37	10.39	4.22	6.71	3.40	0.78	8.78	0.89	89.18
43	34.16	0.37	3.69	0.93	0.88	0.64	1.42	3.58	2.67	1.98	9.79	6.29	1.37	8.58	3.03	1.69	1.25	0.90	1.20	5.53	91.96
44	22.37	6.46	8.34	1.22	13.51	0.49	1.10	0.08	0.20	2.40	0.33	1.44	0.83	10.84	2.37	3.09	0.82	4.23	1.30	1.54	88.23





## CORRELACIO CPH1 (FUNCIO 2)

	n	P(1)	P(2)	P(3)	P(4)	O.O.	r
FAMILIA 1							
F	2	14.80	81.490	7.990	4.610	4.621	0.251
M	3	16.66	0.102	9.490	-2.340	2.485	0.401
T	5	15.74	0.133	6.090	-2.450	2.670	0.324
FAMILIA 2							
F	3	20.01	0.125	14.090	-0.899	2.522	0.397
M	2	22.01	0.079	18.330	-2.040	2.580	0.526
T	5	19.95	0.120	15.520	-0.790	2.450	0.529
FAMILIA 3							
F	3	25.76	0.090	21.004	-1.828	2.343	0.613
M	2	39.01	0.062	35.055	-2.448	3.253	0.731
T	5	32.72	0.060	27.110	-3.700	2.790	0.718
FAMILIA 4							
F	6	42.65	0.070	28.760	-3.980	2.108	0.710
M	2	116.12	0.735	29.250	2.589	4.268	0.568
T	8	20.82	0.606	22.080	5.260	5.630	0.626
FAMILIA 5							
F	3	22.96	0.127	8.554	-6.431	0.518	0.641
M	2	35.19	0.028	-5.018	-38.310	1.726	0.604
T	5	20.98	0.168	10.470	-2.040	1.710	0.767
FAMILIA 6							
F	2	30.97	0.062	64.100	5.081	8.580	0.158
M	3	120.90	0.011	4.258	-141.770	-14.380	0.475
T	5	21.25	0.020	-5.360	-1.920	10.680	0.142
TOTAL							
F	19	16.30	44.080	21.010	6.700	6.710	0.723
M	14	36.71	0.040	30.710	-5.800	3.390	0.827
T	33	17.07	0.370	19.880	4.900	5.430	0.797

## CORRELACIO CPHB (FUNCIO -2)

	n	P(1)	P(2)	P(3)	P(4)	O.O.	r
FAMILIA 1							
F	2	13.14	-0.091	5.381	0.857	8.783	0.347
M	3	23.86	-0.130	0.394	0.868	0.866	0.366
T	5	25.75	-0.114	-2.650	0.693	10.870	0.435
FAMILIA 2							
F	3	10.81	-0.009	3.733	1.150	6.084	-0.008
M	2	7.90	-0.110	20.660	3.140	7.299	0.151
T	5	9.46	-0.030	13.230	2.663	7.002	0.073
FAMILIA 3							
F	3	12.49	-0.139	14.120	3.697	11.170	0.322
M	2	15.50	-0.080	14.420	3.210	12.900	0.246
T	5	14.07	-0.108	13.580	3.520	12.060	0.380
FAMILIA 4							
F	6	26.49	-773.250	3.934	4.490	26.490	-0.001
M	2	16.22	-0.033	30.070	-15.180	8.404	0.196
T	8	21.03	-0.015	20.160	-12.750	7.370	0.292
FAMILIA 5							
F	3	8.44	-74.958	10.730	3.945	8.440	0.302
M	2	15.44	-47.750	-0.019	4.070	15.420	0.683
T	5	9.80	-103.340	10.970	4.030	9.800	0.399
FAMILIA 6							
F	2	4.42	-66.500	4.079	4.064	4.422	-0.001
M	3	9.61	-47.317	5.697	3.653	9.600	-0.001
T	5	65.36	-0.040	-14.060	-5.370	16.860	0.199
TOTAL							
F	19	13.50	-0.060	1.770	2.940	8.590	0.332
M	14	12.48	-0.250	9.310	3.360	11.280	0.531
T	33	16.29	-0.080	2.730	2.370	10.300	0.512