



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Efectes de les condicions d'il·luminació en el ritme d'activitat motora de la rata

Jordi Vilaplana i Hortensi



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

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

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

69

P.N.

EFFECTE DE LES CONDICIONS D'IL·LUMINACIÓ EN EL RITME D'ACTIVITAT MOTORA DE LA RATA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES
HUMANES I DE LA NUTRICIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT:
METODOLOGIES ACTUALS EN CIÈNCIES BIOMÈDIQUES

BIENI 1990-1991

TESI PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE
DOCTOR EN BIOLOGIA

DIRECTOR: DR. ANTONI DíEZ NOGUERA
TUTOR: DR. MIQUEL MORETÓ PEDRAGOSA

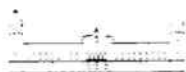
JORDI VILAPLANA I HORTENSI

BARCELONA 1993

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084139



Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. (93) 411 25 89
(93) 490 78 49
Fax (93) 490 82 74

Departament de Ciències Fisiològiques
Humanes i de la Nutrició

ANTONI DíEZ NOGUERA, Professor Titular de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICA que la memòria titulada "Efecte de les condicions d'il·luminació en el ritme d'activitat motora de la rata" presentada per JORDI VILAPLANA i HORTENSI per optar al Grau de Doctor en Biologia, ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, i considerant-la conclosa autoritza la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè consti, signa la present a Barcelona, 16 de Novembre de 1993.

Dr. Antoni Díez Noguera

ABREVIACIONS

AM	Activitat motora.
RAM	Ritme d'activitat motora.
CEL	Component encarrilable per la llum.
CFR	Corba de fase resposta
CNEL	Component no encarrilable per la llum.
FF	Foscor constant.
IA/D	Index d'activació / desactivació.
ICP	Index de constància del patró.
LF	Cicle llum-foscor.
LL	Llum constant.
NSQ	Nucli supraquiasmàtic.
T	Període.
tau	Període endogen d'un ritme biològic.
TC	Temps circadiari.

INDEX DE MATÈRIES

1.- INTRODUCCIÓ	1
1.1.- PROPIETATS RITMES BIOLOGICS	3
1.1.1.- PERÍODE ENDÒGEN	3
1.1.1.1.- Llum	3
1.1.1.2.- Temperatura	4
1.1.1.3.- Condicions experimentals	4
1.1.1.4.- Factors interns	4
1.1.1.5.- Postefectes	5
1.1.1.6.- Temps circadiari	5
1.1.2.- SINCRONITZACIO	5
1.1.2.1.- Marges d'encarrilament	6
1.1.2.2.- Corba de Fases de Resposta	6
1.1.3.- MASKING	7
1.2.- SISTEMA CIRCADIARI	9
1.2.1.- NUCLIS SUPRAQUIASMATICS	9
1.2.1.1.- Anatomia	10
1.2.1.2.- Neuroquímica dels NSQ	12
1.2.1.3.- Resposta a la llum dels NSQ	13
1.2.2.- ALTRES ELEMENTS: GLANDULA PINEAL	13
1.2.2.1.- Efectes de retroacció sobre els NSQ	15
1.3.- DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA CIRCADIARI	15
1.3.1.- INFLUENCIA DE LA EDAT SOBRE ELS RC	16
1.3.2.- INFLUENCIA DE LA LLUM SOBRE ELS RC	16
1.4.- RITME D'ACTIVITAT MOTORA	17
1.5.- ACOBLAMENT	17
1.6.- ORGANITZACIO DEL SISTEMA CIRCADIARI	18
1.6.1.- Sistema multioscil.lador	18
1.6.2.- INFLUÈNCIA DEL SEXE	20
2.- MATERIAL I MÈTODES	21
2.1.- ANIMALS	22
2.2.- CONDICIONS DE MANTENIMENT	22
2.3.- APARELLS	24
2.3.1.- DETECCIÓ DE L'ACTIVITAT MOTORA	24
2.3.2.- CONTROL DE LA ILUMINACIÓ	24
2.3.3.- CONTROL DE LA TEMPERATURA	25
2.4.- PINEALECTOMIA	25
2.4.1.- PINEALECTOMIA EN NADONS	25
2.4.2.- PINEALECTOMIA EN ANIMALS ADULTS	26

2.4.3.- ANIMALS DE REFERÈNCIA: <i>SHAM</i>	26
2.4.4.- VERIFICACIÓ DE LES PINEALECTOMIES	26
2.5.- TRACTAMENT I ANÀLISI DE LES DADES	26
2.5.1.- DOBLE GRÀFICA	27
2.5.2.- MATRIUS GRÀFIQUES	28
2.5.3.- TRACTAMENT GRÀFIC D'IMATGES	29
2.5.3.1.- Mitjana mòbil (M)	30
2.5.3.2.- Reducció (R)	30
2.5.3.3.- Equalització (Q)	30
2.5.3.4.- Agregació (A)	30
2.5.4.- PERIODOGRAMA DE SOKOLOVE-BUSHELL	31
2.5.5.- ANÀLISI DE ESPECTRAL	31
2.5.6.- ANÀLISI DEL COSINOR	31
2.5.7.- FORMA D'ONA	32
2.5.8.- QUANTIFICACIÓ DEL SOROLL	32
2.5.9.- ÍNDEX DE CONSTÀNCIA DEL PATRÓ (ICP)	33
2.5.10.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ / DESACTIVACIÓ (IA/D)	33
2.5.11.- INCREMENT DE L'ACTIVITAT PRÈVIA A LA FASE DE FOSCOR	33
2.5.12.- CÀLCUL DE LS FASES DE SORTIDA	34
2.5.13.- INTERACCIÓ DE RITMES	34
2.6.- SOFTWARE	36
3.- EXPERIMENT 1:	
ESTUDI DE L'ACTIVITAT MOTORA DE RATES JOVES SITUADES EN CICLES SIMÈTRICS DE LLUM/FOSCOR DE DIFERENT PERÍODE	37
3.1.- OBJECTIU	38
3.2.- DISSENY	38
3.3.- RESULTATS	39
3.3.1.- DOBLES GRAFIQUES A 24 HORES	39
3.3.2.- DOBLES GRÀFIQUES A MÓDUL T	40
3.3.3.- PERÍODES EN LA FASE DE LLUM/FOSCOR	41
3.3.4.- MATRIUS GRÀFIQUES	42
3.3.5.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA	42
3.3.6.- FASE ALFA I FASE RHO	43
3.3.7.- FASES DE SORTIDA EN EL CURS LLIURE	44
3.3.8.- PERÍODE EN CURS LLIURE	45
3.3.9.- ANÀLISIS DELS COMPONENTS NO ENCARRILABLES PER LA LLUM DELS GRUPS T22 I T23	45
3.3.9.1.- Interacció entre el component no encarrilable per la llum i l'encarrilable	46

3.3.9.2.- Comparació dels períodes del component no encarrilable per la llum	46
3.3.9.3.- Relació entre el període del component no encarrilable per la llum i el període en curs lliure ..	46
3.3.9.4.- ICP del component encarrilable per la llum i del component no encarrilable	47
3.4.- DISCUSSIÓ	48
4.- EXPERIMENT 2	
ESTUDI DE L'ACTIVITAT MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A DIFERENTS INTENSITATS DE LLUM	53
4.1.- OBJECTIU	54
4.2.- DISSENY	54
4.3.- RESULTATS	55
4.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES	55
4.3.2.- PERÍODES DEL COMPONENT CIRCADIARI	56
4.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES	57
4.3.4.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA	58
4.3.5.- SOROLL PRESENT EN EL PATRÓ	59
4.3.6.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ/DESACTIVACIÓ	60
4.3.7.- ÍNDEX DE CONSTNCIA DE PATRÓ	60
4.4.- DISCUSSIÓ	60
5.- EXPERIMENT 3	
ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A DIFERENTS INTENSITATS DE LLUM	65
5.1.- OBJECTIU	66
5.2.- DISSENY	66
5.3.- RESULTATS	67
5.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES	67
5.3.2.- PERIODE DEL COMPONENT ENDÒGEN	68
5.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES	68
5.3.4.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA	69
5.3.5.- SOROLL PRESENT EN EL PATRÓ	69
5.3.6.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ/DESACTIVACIÓ	69
5.3.7.- ÍNDEX DE CONSTÀNCIA DE PATRÓ	70
5.4.- DISCUSIÓ	70
6.- EXPERIMENT 4	

ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT
MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A PATRONS ULTRADIARIS DE
LLUM/FOSCOR

.....	73
6.1.- OBJECTIU	74
6.2.- DISSENY	74
6.3.- RESULTATS	76
6.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES	76
6.3.2.- TAUS EN LA FASE FF I EN LA FASE T4	76
6.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES	77
6.3.4.- POTÈNCIES DELS HARMÒNICS 6 I 12 DURANT LA FASE T4	77
6.3.5.- PATRÓ CÍCLIC MITJÀ DURANT LA FASE T4 ...	78
6.3.6.- TRANSISIÓ ENTRE LES FASES T4 I LES FF	78
6.4.- DISCUSIÓ	79

7.- EXPERIMENT 5

ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT
MOTORA DE RATES ADULTES SITUADES A PATRONS ULTRADIARIS
DE LLUM/FOSCOR.

.....	81
7.1.- OBJECTIU	82
7.2.- DISSENY DE L'EXPERIMENT #5	82
7.3.- RESULTATS	84
7.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES	84
7.3.2.- TAUS DURANT LES FASES DE FOSCOR CONSTANT	86
7.3.3.- MATRIUS GRAFIQUES	86
7.3.4.- POTÈNCIES DELS HARMÒNICS 6 I 12 DURANT LES FASES T4	87
7.3.5.- PATRÓ MITJÀ DIARI D'ACTIVITAT MOTORA DURANT LES FASES T4	88
7.3.6.- CONDUCTA ANTICIPATÒRIA	89
7.3.7.- PESOS DELS ANIMALS AL FINAL DE L'EXPERIMENT	89
7.3.8.- TRANSISIÓ ENTRE LES FASES T4 I LES FF	90
7.4.- DISCUSIÓ	90

8.- CONCLUSIONS	93
-----------------------	----

9.- BIBLIOGRAFIA	97
------------------------	----

10.- FIGURES I TAULES	105
---------------------------------	-----

INDEX DE TAULES

Taula 1.	124
Taula 2.	133
Taula 3.	133
Taula 4.	134
Taula 5.	134
Taula 7.	135
Taula 9.	136
.....	143
Taula 10. Valors mitjans de tau per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.	143
Taula 11. Anàlisi de la variança dels valors tau.	143
Taula 12. Valors mitjans del contingut de "soroll" per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.	144
Taula 13. Anàlisi de la variança dels valors del contingut de "soroll".	144
Taula 14. Valors mitjans de l'índex d'activació/desactivació (IA/D) per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.	145
Taula 15. Anàlisi de la variança dels valors de l'índex d'activació/desactivació (IA/D)	145
Taula 16. Valors mitjans de l'índex de constància del patró per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació. ...	146
Taula 17. Anàlisi de la variança dels valors de l'índex de constància del patró.	146
Taula 18. Valors mitjans del tau observat sota cicles LF de 4 hores.	151
Taula 19. Anàlisi de la variança dels valors de tau sota cicles LF de 4 hores.	151
Taula 20. Valors mitjans del tau en curs lliure (FF) després d'estar sota cicles LF de 4 hores.	152
Taula 21. Anàlisi de la variança dels valors de tau en curs lliure (FF) després d'estar sota cicles LF de 4 hores.	152
Taula 22. Valors mitjans de les diferències de tau sota cicles LF de 4 hores i en curs lliure (FF).	153
Taula 23. Anàlisi de la variança de les diferències de tau sota cicles LF de 4 hores i en curs lliure (FF).	153
Taula 24. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant els dies 20 a 79.	155
Taula 25. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant els dies 20 a 79.	155
Taula 26. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de fosc constant F2 i F1.	177

Taula 27. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de foscó constant F3 i F2.	177
Taula 28. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de foscó constant F4 i F3.	177
Taula 29. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant la primera fase sota T4.	179
Taula 30. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant la segona fase sota T4.	179
Taula 31. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant la primera fase sota T4.	180
Taula 32. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant la segona fase sota T4.	180
Taula 33. Valors mitjans de les diferències de fases relatives (activitat respecte foscó) entre T4 ₁ i T4 ₂	182
Taula 34. Anàlisi de la variança dels valors de les diferències de fases relatives (activitat respecte foscó) entre T4 ₁ i T4 ₂	182
Taula 35. Valors mitjans dels increments d'activitat previs a la foscó, durant la primera fase sota T4.	183
Taula 36. Anàlisi de la variança dels valors dels increments d'activitat previs a la foscó, durant la primera fase sota T4.	183
Taula 37. Valors mitjans dels increments d'activitat previs a la foscó, durant la segona fase sota T4.	184
Taula 38. Anàlisi de la variança dels valors dels increments d'activitat previs a la foscó, durant la segona fase sota T4.	184
Taula 39. Valors mitjans dels pesos dels animals al final de l'experiment.	185
Taula 40. Anàlisi de la variança dels valors dels pesos dels animals al final de l'experiment.	185

INDEX DE FIGURES

Figura 1. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 22 hores de període (T22). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	106
Figura 2. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 23 hores de període (T23). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	107
Figura 3. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 24 hores de període (T24). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	108
Figura 4. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 25 hores de període (T25). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	109
Figura 5. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 26 hores de període (T26). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	110
Figura 6. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 27 hores de període (T27). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	111
Figura 7. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 28 hores de període (T28). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	112
Figura 8. Dobles gràfiques en mòdul 22 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 22 hores de període (T22). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	113
Figura 9. Dobles gràfiques en mòdul 23 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 23 hores de període (T23). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	114
Figura 10. Dobles gràfiques en mòdul 25 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 25 hores de període (T25). A	

partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	115
Figura 11. Dobles gràfiques en mòdul 26 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 26 hores de període (T26). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	116
Figura 12. Dobles gràfiques en mòdul 27 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 27 hores de període (T27). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	117
Figura 13. Dobles gràfiques en mòdul 28 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 28 hores de període (T28). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.	118
Figura 14. Representació gràfica dels periodogrames corresponents als dies 0 a 60. L'interval d'exploració va de 21.5 h (1290 min) fins a 28.5 h (1710 min) amb increments de 5 min. La línia de punts representa un nivell de significació $p=0.05$. Cada columna correspon a un patró d'il.luminació. Els pics més significatius corresponen a T.	119
Figura 15. Matrius gràfiques mitjanes dels sis animals de cada condició d'il.luminació, corresponents als dies 0 a 60. Els espectres de potència han estat calculats en base al període exògen. Cada ratlla representa una potència del 2%.	120
Figura 16. Formes d'ona mitjanes sota cada condició d'il.luminació calculades a partir de les formes mitjanes de cada animal. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries (les mateixes a totes les gràfiques) i el temps com a temps circadiari. L'interval correspon als dies 0 a 60 en que els animals es trobaven en LF.	121
Figura 17. Doble gràfic de les formes d'ona mitjanes de la figura anterior. Es mostra la variació de la fase alfa (zona ratllada) i la seva relació amb la fase de foscor per a cada període extern T.	122
Figura 18. Representació de la relació entre les fases alfa i rho. A) en valors absoluts (temps circadiari) i B) com a cocient entre l'activitat motora durant la fase alfa i la fase rho.	122
Figura 19. Fases de sortida al posar els animals en FF. Totes les fases estan calculades en base a l'hora local. Cada punt correspon a l'acrofase d'un animal.	123
Figura 20. Relació entre el tau dels animals en curs lliure (FF) i el T previ. La corba correspon a un ajust polinòmic de tercer grau. El	

rombe negre correspon al punt d'inflexió i cal destacar que en aquest punt coincideix T, tau.	124
Figura 21. Mitjanes i error estàndar de l'amplitud de les oscil·lacions del nivell d'activitat durant les fases fosca (AF) i amb llum (AL) per als animals dels grups T22 i T23. Als dos grups hi ha diferències amb $p < 0.005$	125
Figura 22. A) Mitjanes i errors estàndar dels períodes dels components no encarrilables per la llum en els animals dels grups T22 i T23. No s'han trobat diferències estadísticament significatives. B) Relació entre els períodes anteriors i el tau de cada animal en curs lliure (FF).	125
Figura 23. En A i B es comparen els períodes mitjans dels dos components (encarrilable i no encarrilable per la llum) de forma aparellada en els grups T22 i T23, trobant-se diferències significatives ($p < 0.05$) en els dos casos. En C i D es comparen els grups T22 i T23 per a cada component, trobant-se diferències tant sols en D (component no encarrilable).	126
Figura 24. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota "fosc constant" (L0.25) equivalent a una dèbil llum vermella d'incandescència que produïa un nivell d'il·luminació menor de 0.025 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.	127
Figura 25. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L4) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produïen un nivell d'il·luminació de 4 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles. Per raons d'espai el cinquè mascle està representat a la figura següent.	128
Figura 26. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L37) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produïen un nivell d'il·luminació de 37 lux. La columna de la dreta i l'inferior esquerra corresponen a les femelles. A l'esquerra es troben els mascles. Per raons d'espai el primer mascle és del grup L4.	129
Figura 27. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L497) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produïen un nivell d'il·luminació de 497 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.	130
Figura 28. Matrius gràfiques mitjanes dels animals de cada condició d'il·luminació. Els espectres de potència han estat calculats en base al tau individual. Cada ratlla representa una potència del 2%. De dalt a baix les files corresponen als grups L0.25, L4, L37 i	

L497. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.	131
Figura 29. Formes d'ona mitjanes sota cada condició d'il.luminació calculades a partir de les formes mitjanes de cada animal. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries (les mateixes a totes les gràfiques) i el temps com a temps circadiari. De dalt a baix les files corresponen als grups L0.25, L4, L37 i L497. . .	132
Figura 30. Representació gràfica de la relació entre el període endògen tau i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la corba exponencial de regressió (no linial).	133
Figura 31. Representació gràfica de la relació entre el contingut de "soroll" present en els patrons d'activitat motora i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).	134
Figura 32. Representació gràfica de la relació entre l'índex d'activació/desactivació (IA/D) i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).	135
Figura 33. Representació gràfica de la relació entre l'índex de constància del patró d'activitat motora i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).	136
Figura 34. Dobles gràfiques dels animals <i>Sham</i> mantinguts sota "fosc constant" (llum vermella <0.025 lux). La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles. Per raons d'espai el cinquè mascle està representat a la figura següent.	137
Figura 35. Dobles gràfiques dels animals pinealectomitzats mantinguts sota "fosc constant" (llum vermella <0.025 lux). La columna de la dreta i l'inferior esquerra corresponen a les femelles. A l'esquerra es troben els mascles. Per raons d'espai el primer mascle és del grup L4.	138
Figura 36. Dobles gràfiques dels animals <i>Sham</i> mantinguts sota llum constant. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.	139
Figura 37. Dobles gràfiques dels animals pinealectomitzats mantinguts sota llum constant. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.	140
Figura 38. Matrius gràfiques mitjanes de cada situació experimental. Els espectres de potència s'han calculat en base al tau individual. Cada ratlla representa un 2% de potència. De dalt a baix	

corresponen als grups FF- <i>Sham</i> , FF-Px, LL- <i>Sham</i> i LL-Px. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.	141
Figura 39. Formes d'ona mitjanes per a cada situació experimental calculades a partir de les mitjanes individuals. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries respecte el temps circadiari. De dalt a baix corresponen als grups FF- <i>Sham</i> , FF-Px, LL- <i>Sham</i> , LL-Px. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.	142
Figura 40. Dobles gràfiques dels mascles <i>Sham</i> mantinguts sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.	147
Figura 41. Dobles gràfiques dels mascles pinealectomitzats mantinguts sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.	148
Figura 42. Dobles gràfiques de les femelles <i>Sham</i> mantingudes sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.	149
Figura 43. Dobles gràfiques de les femelles pinealectomitzades mantingudes sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.	150
Figura 44. Matrius gràfiques mitjanes dels animals agrupats per sexe i tipus de manipulació. Els espectres de potència han estat calculats en base a 24 hores. Cada ratlla representa una potència del 2%. La fila de dalt correspon a animals <i>Sham</i> i la de baix als pinealectomitzats. Els mascles són a la dreta i a l'esquerra les femelles.	154
Figura 45. Formes d'ona mitjanes per a cada situació experimental durant la fase sota T4, calculades a partir de les mitjanes individuals. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries respecte el temps circadiari. De dalt a baix corresponen als grups mascles- <i>Sham</i> , mascles-Px, femelles- <i>Sham</i> , femelles-Px.	156
Figura 46. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dos mascles. A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop processades.	157
Figura 47. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dues femelles. A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop processades.	158
Figura 48. Doble gràfica del registre del nivell d'il.luminació, durant tot l'experiment.	159
Figura 49. Doble gràfica, corresponent al mascle 8 (<i>Sham</i>).	160
Figura 50. Doble gràfica, corresponent al mascle 18 (<i>Sham</i>).	161

Figura 51. Doble gràfica, corresponent al mascle 28 (<i>Sham</i>). . . .	162
Figura 52. Doble gràfica, corresponent al mascle 38 (<i>Sham</i>). . . .	163
Figura 53. Doble gràfica, corresponent al mascle 13 (pinelectomitzat).	164
Figura 54. Doble gràfica, corresponent al mascle 23 (pinelectomitzat).	165
Figura 55. Doble gràfica, corresponent al mascle 33 (pinelectomitzat).	166
Figura 56. Doble gràfica, corresponent al mascle 43 (pinelectomitzat).	167
Figura 57. Doble gràfica, corresponent a la femella 48 (<i>Sham</i>). .	168
Figura 58. Doble gràfica, corresponent a la femella 58 (<i>Sham</i>). .	169
Figura 59. Doble gràfica, corresponent a la femella 68 (<i>Sham</i>). .	170
Figura 60. Doble gràfica, corresponent a la femella 78 (<i>Sham</i>). .	171
Figura 61. Doble gràfica, corresponent a la femella 53 (pinelectomitzat).	172
Figura 62. Doble gràfica, corresponent a la femella 63 (pinelectomitzat).	173
Figura 63. Doble gràfica, corresponent a la femella 73 (pinelectomitzat).	174
Figura 64. Doble gràfica, corresponent a la femella 83 (pinelectomitzat).	175
Figura 65. Representació gràfica dels valors de tau durant les diferents fases de fosc constant.	176
Figura 66. Matrius gràfiques mitjanes dels animals agrupats per sexe i tipus de manipulació. Els espectres de potència han estat calculats en base a 24 hores. Cada ratlla representa una potència del 2%. La fila de dalt correspon a animals <i>Sham</i> i la de baix als pinelectomitzats. Els mascles són a la dreta i a l'esquerra les femelles.	178
Figura 67. Formes d'ona mitjanes per a cada situació experimental durant les fases T4 ₁ (esquerra) i T4 ₂ (dreta) , calculades a partir de les mitjanes individuals. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries respecte el temps circadiari. De dalt a baix corresponen als grups mascles- <i>Sham</i> , mascles-Px, femelles- <i>Sham</i> , femelles- Px.	181
Figura 68. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dos mascles. A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop processades.	186

Figura 69. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dues femelles.
A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop
processades. 187

1.- INTRODUCCIÓ

El fet que els tots els essers vius presentin oscil·lacions en la gran majoria dels processos que realitzen, representa la seva capacitat de mesurar el temps i de poder estructurar les seves funcions segons els cicles externs. Molts dels processos que tenen lloc en els essers vius poden ser predibles. Podem imaginar canvis tant fisiològics com conductuals que es produeixen lligats a canvis en el medi extern, com per exemple, degut al dia o a la nit, a les mareas o a les estacions de l'any.

No és sorprenent doncs que aquesta capacitat de mesurar el temps vingui lligada al genoma i sigui heretada com qualsevol altre característica fisiològica.

La capacitat de mesurar el temps, vindria donada per una estructura que s'hauria de comportar de manera similar a un rellotge. Ha de ser capaç de mesurar el temps en absència de senyals externes periòdiques, ha de funcionar independentment de les influències externes, el ritme que genera és endògen, ha de ser capaç d'enviar senyals a la resta de l'organisme i per últim cal que sigui capaç de ser sincronitzat, posat a l'hora, pels cicles externs. Aquesta estructura és el rellotge biològic.

Aquest rellotge, o oscil·lador, al donar senyals de temps a l'organisme permet:

- Realitzar activitats en el moment adequat. Per exemple estar desperts durant el dia, o en animals amb reproducció un cop l'any, reproduir-se en el moment adequat.
- Mesurar el temps. Per exemple coneixer l'estació de l'any per la mesura del nombre d'hores de llum que té un dia.

De tots els possibles rellotges, el que sembla haver estat seleccionat per la evolució és el rellotge que genera ritmes de període proper a les 24 hores. Això no ens pot sorprendre si tenim en compte que els ritmes de 24 hores són una característica de la terra. Tenim en compte aquest fet tampoc ens sorprèn que moltes de les característiques del rellotge biològic siguin comuns per tots els organismes: Gran precisió i estabilitat, resposta a polsos de llum, compensació de la temperatura (Pittendrigh i Caldarola 1973), o el que el mecanisme del rellotge sigui degut a un oscil·lador, es a dir a un sistema que repeteix el mateix cicle fisiològic cada 24 hores, i no pas a un sistema que utilitzi mecanismes no

oscillatoris, com podria ser un mecanisme homeostàtic o un sistema que mesurés la freqüència de aconteixaments importants.

De tota manera cal tenir present que l'ordre temporal no es conseqüència de l'adaptació als canvis externs, l'oscil·lació ja existia inicialment (no el desordre o atzar). Després la selecció natural va triar aquells cicles que presentaven una freqüència propera a la diària.

1.1.- PROPIETATS RITMES BIOLOGICS

Els articles clàssics de Pittendrigh i Daan (1976 a,b) i Daan i Pittendrigh (1976 a,b) mostren les principals característiques dels ritmes biològics. Una de les característiques és que el període del ritme endògen, que es manifesta en curs lliure, és sempre diferent de 24 hores, però sempre proper, per tant sempre circadiari. D'altre banda aquest ritme endògen ha de ser capaç de ser modificat per tal d'adaptar-se als cicles externs, es a dir ha de ser capaç de sincronitzar.

1.1.1.- PERÍODE ENDÒGEN

Quan un organisme es troba en condicions constants, condicions en curs lliure, presenta un ritme de període τ (tau). τ és sempre proper a les 24 hores, es circadiari, però mai exacte. La durada de τ depèn de l'espècie animal, del propi individu, de l'estat fisiològic de l'individu, de les condicions ambientals i de la història experimental. Anem a comentar alguns dels factors que més influeixen el tau:

1.1.1.1.- Llum

La intensitat lluminosa a la que està sotmès el animal influeix molt en el període del ritme endògen. Aschoff (1960) va resumir els efectes de la llum en les denominades tres regles d'Aschoff, que són les següents:

- Prime regla: Quan incrementa la intensitat de llum disminueix el τ en animals diurns i incrementa en nocturns.
 - Segona regla: Quan incrementa la intensitat de llum, la relació entre el tems d'activitat (α) i el temps de repòs (ρ) incrementa en animals diurns. En animals nocturns α/ρ disminueix.
-

- Tercera regla: El τ en DD és superior a 24 hores en animals diurns i inferior a 24 h en nocturns.

La tercera regla és la que menys es compleix, però el que és cert és que els animals nocturns tenen $\tau_{LL} > \tau_{DD}$ i els diurns $\tau_{LL} < \tau_{DD}$.

De vegades la llum produeix arritmicitat. Els animals sotmesos durant un temps sota condicions de LL poden presentar pèrdua de la ritmicitat circadiana i gran nombre de components ultradiaris (Boulos i Terman, 1979; Eastman i Rechtschaffen, 1983). De tota manera cal tenir present que una aritmicitat no necessàriament suposa pèrdua del ritme sino potser desacoblament entre els oscil·ladors que formen el oscil·lador circadian (Aschoff 1981).

1.1.1.2.- Temperatura

La major part d'experimentació sobre la compensació de la temperatura dels rellotges biològics s'ha realitzat en organismes no termoregulats (insectes i plantes), presentant-se en aquestes espècies compensació de la temperatura (Hastings i Sweeney, 1957). En microorganismes el procés de compensació de la temperatura sembla ser heretat genèticament (Feldman 1971). En mamífers també es presenta compensació de la temperatura, però en animals no hivernants com la rata, la compensació no és tant bona com la que s'observa en hamsters i altres animals hivernants, essent la millor compensació a temperatures properes a la temperatura normal del cos (Gibbs 1980).

1.1.1.3.- Condicions experimentals

De vegades el tau pot variar segons les condicions en que realitzem l'experiment. Per exemple, la presència d'un refugi a la gàbia d'un animal produeix un escurçament del tau (...) això es pot explicar ja que ell mateix pel fet de poder-se amagar es sotmet a un cicle LD. En altres exemples s'ha trobat com la presència d'una roda giratòria produeix un increment de τ (...) i els animals que viuen en col·lectivitat presenten un tau més curt que els que viuen aïllats (...).

1.1.1.4.- Factors interns

Altres factors que influeixen el tau són per exemple les hormones S'ha trobat també diferència del tau segons el sexe (...) i segons la

edat de l'animal (...) presentant els animals vells un tau més curt que els animals joves.

1.1.1.5.- Postefectes

Són els efectes de les condicions prèvies a que havien estat sotmesos els animals (Pittendrigh 1960). Tenen relació amb el període del cicle extern, T , al que havien estat sotmesos. τ és més llarg mentre més llarg hagi estat el T a que havia sincronitzat (Aschoff 1981). Igualment alguns canvis de fase poden modificar el període. Així molt sovint avanços de fase produeixen escurçament del ritme i retrastos allargament del ritme. Si l'animal sempre ha estat sota condicions de curs lliure, la intensitat de llum a la que ha estat sotmés inicialment pot també variar el tau que mesurem.

1.1.1.6.- Temps circadiari

Per tal d'uniformitzar les fases dels ritmes circadiaris que puguin presentar diferents organismes, independentment dels diferents taus, s'acostuma a parlar de **temps circadiari**. Aquest temps és el que considera com a llargada del "dia subjectiu" el tau de l'animal, per tant les hores circadianes valdràn les hores reals que expresa el cocient τ (en hores) / 24.

1.1.2.- SINCRONITZACIO

Tal com s'ha comentat anteriorment, quan un organisme es troba sota condicions ambientals cícliques, de període T , modifica el seu ritme endògen per tal d'adaptar-lo a les condicions externes. D'aquesta manera τ adquireix el mateix valor que T . Aquest fet reb el nom de sincronització o "encarrilament". Els factors externs cíclics que poden produir sincronització són els sincronitzadors o "zeitgebers".

Quan el ritme està sincronitzat manté una relació de fases determinada amb el zeitgeber. Aquesta relació de fases depèn de la "força" del zeitgeber. Es a dir de les propietats del zeitgeber i de la resposta del sistema circadiari a les senyals del zeitgeber. Per a un zeitgeber de força determinada la relació de fases depèn del fotoperíode (Aschoff 1981).

1.1.2.1.- Marges d'encarrilament

Per que tingui lloc la sincronització T només pot diferir de τ un temps determinat. Els límits dels valors de T són els que determinen els marges d'encarrilament. Fora d'aquests límits el ritme va en curs lliure i només és modulat per les senyals del zeitgeber quan coincideixen en algunes fases. Els marges d'encarrilament són difícils de determinar, depenen de la força del zeitgeber i del grau de persistència. Aschoff (1978) va estudiar la capacitat de sincronització de 19 espècies d'animals i va concloure el següent: 1) que els marges d'encarrilament són relativament petits en vertebrats (unes 10 hores) comparat amb els dels invertebrats i sobretot els extrems que són plantes i organismes unicel·lulars. 2) Mentre més gran sigui el marge d'encarrilament més petit és el canvi en la relació de fase entre el zeitgeber i el pacemaker per 1 hora de canvi en el període del zeitgeber. 3) Existeixen rangs d'encarrilament secundaris al voltant de valors de T que siguin múltiples o submúltiples de τ (encarrilament per demultiplicació).

De fet és difícil mesurar exactament els marges d'encarrilament ja que a més es poden presentar fenòmens tals com sincronització relativa, sincronització parcial, *bouncing*... (Pittendrigh i Daan 1976) que fan difícil determinar si s'ha produït o no sincronització. Normalment els marges d'encarrilament són entre 18 i 30 hores com a límits extrems. A la rata per exemple s'ha trobat que el ritme de activitat alimentària sincronitzava a cicles entrei ... (Madrid) Tot i que s'han descrit varis sincronitzadors per les diferents espècies. El sincronitzador o "Zeitgeber" més important i comú per tots els organismes és l'alternança entre llum-fosc. (cicles LD), i serà a aquest al que ens referirem.

Per demostrar que té lloc l'encarrilament d'una variable rítmica a un cicle extern s'han de complir algunes condicions (Boulos i Terman 1980). El factor cíclic extern ha de ser capaç de controlar la fase, i per tant el període, del ritme manifest. La fase del ritme manifest ha de representar la fase de l'oscil·lador. A més, després de l'exposició al ritme extern, la fase inicial del ritme en curs lliure ha de correspondre a la fase que s'ha adquirit durant l'exposició al cicle.

1.1.2.2.- Corba de Fases de Resposta

Si tenim un animal, per exemple una rata, en condicions de fosc constant, i a diferents fases del seu ritme apliquem un estimul, un pols

de llum, observarem que cada pols produeix un avanç o un retràs de fase del ritme. Si grafiquem aquests avanços o retrastos en funció de la fase del cicle a la que s'ha aplicat el pols de llum obtindrem la Corba de Fases de Resposta (CFR). Aquí la oscil·lació es descriu en termes de temps circadiari (CT). L'inici de la nit subjectiva, a la rata l'inici d'activitat, correspon al CT12. A part de l'estratègia comentada, hi ha altres maneres d'obtenir la CFR. Aschoff (1965) va proposar 6 estratègies diferents per a obtenir la CFR per a un estímul lluminós.

Tot i que la forma de les CFR dels diferents animals és diferent, hi ha certes característiques comuns de les CFR totes les espècies (Aschoff 1981): 1) Durant el dia subjectiu, que va desde CT0 a CT12 es presenta molt poca resposta a la llum. 2) Durant la nit subjectiva, de CT12 a CT0 la resposta a la llum és elevada. 3) Els retrastos de fase es presenten quan l'estímul s'aplica al final del dia subjectiu i principi de la nit subjectiva. 4) els Avanços de fase es presenten al final de la nit subjectiva i principi del dia subjectiu. 5) La corba sol ser asimètrica.

S'ha observat també una relació entre la forma de la CFR que presenta un animal determinat i el seu tau. En rosegadors mentre més curt és tau més gran es la relació entre l'àrea sota la corba de la part dels retrastos a la CFR i l'àrea sota la corba de la part dels avanços.

La llargada de tau DD determina si un cicle de llum pot sincronitzar per avanços o retrastos diaris. Si $\tau_{DD} > 24$ h el ritme s'ha de resincronitzar més abans, per tal cal un retràs diari i l'entrainment tindrà lloc principalment al matí. Si $\tau_{DD} < 24$ hores la llum del vespre produirà el retràs de fase necessari. Per tant, els animals nocturns estaran més afectats per la sortida del sol i els diurns per la posta de sol. ç

La CFR permet predir els marges d'encarrilament i com un oscil·lador sincronitzarà amb el zeitgeber. En general els límits d'encarrilament serien els que hi ha entre el tau +- el canvi de fase màxim que s'observa a la CFR.

1.1.3.- MASKING

Cal diferenciar entre els fenòmens de encarrilament i *masking*. *Masking* o enmascament és l'acció d'agents externs que poden fer variar l'amplitud, el mesor i la forma d'ona d'un ritme, però que no sincronitzen el mecanisme dels oscil·ladors endògens que el dirigeixen. Aparentment

pot semblar una sincronització, però quan desapareix el cicle extern, que emmascara el endògen, l'animal segueix el seu ritme endògen amb la mateixa fase que seguiria si no s'hagués presentat el cicle extern. En aquest cas no hi ha un control de l'oscil·lador però sí de l'element que analitzem. Hi ha un control de període però no de fase. Minors i Waterhouse (1989) consideren 4 tipus d'influències de *masking*.

- Influències del medi extern directes sobre l'organisme, per exemple la supressió de melatonina per la llum.
- *Masking* produït per canvis conductuals generats per canvis ambientals normals.
- *Masking* produït per canvis de conducta generats per canvis ambientals anormals.
- *Masking* produït per que entre l'oscil·lador i el ritme manifest hi ha una via que es pot modificar a diferents estats.

Segons Aschoff (1989) per diferenciar entre *masking* i encarrilament cal tenir present sobre el *masking* que un ritme circadiari es pot enmascarar per una senyal externa a la que el organisme és sensitiu, independentment de que aquesta senyal pugui o no produir encarrilament. Les senyals de *masking* actuen directament sobre l'organisme, no sobre el pacemaker sol, tot i que pugui actuar sobre tots dos llocs alhora. El *masking* dura mentre dura la senyal de *masking* i no pot haver-hi anticipació a la senyal.

Es suposa que evolutivament el *masking* té raó de ser ja que capacita a l'organisme per actuar immediatament i de manera anòmla a canvis cíclics, el que facilitaria la supervivència.

El *masking* depèn també de la fase circadiana on s'apliqui l'estímul. Per tant pot ser que un animal nocturn al que es disminueix la activitat per estar en LL, recuperi un ritme en curs lliure sota l'influència de polsos repetits de foscor (Aschoff 1989).

Gander i Moore-Ede van estudiar l'efecte de cicles 2L:2D en el ritme d'activitat motora de micos..

1.2.- SISTEMA CIRCADIARI

Als mamífers el control de les ritmicitats té el seu origen en el sistema nerviós. Tot el conjunt d'estructures que regulen el ritmes de l'organisme reb el nom de Sistema Circadiari. Es pot considerar sistema circadiari tan unes estructures anatòmiques determinades com en termes conceptuals una caixa negra que no sabem de que està formada però de la que volem esbrinar el seu funcionament.

Anatomicament, en mamífers els principals components del sistema circadiari són:

- Els NSQ, que són els oscil·ladors.
- La retina, on hi ha els fotoreceptors, que reben la senyal lluminosa del cicle extern.
- La glàndula pineal, que té un paper important en el control dels ritmes circannuals i la reproducció, però que també té un efecte de retroacció sobre els NSQ.

Tot i que ens centrarem exclusivament en els NSQ per ser el principal oscil·lador i per ser a on s'integren els impulsos lluminosos, s'ha postulat la presència d'altres oscil·ladors: un d'ells situat a l'ull induiria ritmes de sensibilitat a la llum (Terman & Terman 1985), un altre seria responsable de l'anticipació a la fase d'accés al menjar sota cicles de menjar restringit (Boulos et al, 1980; Rosenwasser et al, 1984).

1.2.1.- NUCLIS SUPRAQUIASMATICS

Els NSQ són els principals oscil·ladors en mamífers. Hi ha diferents fets que ho proven:

- Quan els NSQ es destrueixen o s'aïllen, per lesions, de la resta del cervell es produeix pèrdua del ritme de la major part de variables fisiològiques i conductuals. (...).
- Les neurones dels NSQ mantenen un ritme de consum de glucosa (Reppert 1984) o elèctric (Green i Gillete, 1982) encara que estiguin aïllats de la resta d'estructures cerebrals. Aquest ritme es manté en condicions de DD i no es troba cap altre ritme semblant

en altres zones del cervell. El consum de glucosa és més alt durant el dia subjectiu de l'animal.

- L'estimulació elèctrica dels NSQ produeix alteració de la fase i del tau dels RC (Rusak & Groos 1982).
- El ritme d'activitat metabòlica, mesurat pel consum de glucosa, es desenvolupa en període prenatal, quan encara l'organisme sencer no presenta ritmes circadianis manifestos, i aquest procés es independent de la ritmicitat de la mare.
- Quan es trasplanta teixit fetal de NSQ a un animal arrítmic, l'animal recupera i manifesta els RC (Sawaki et al, 1984; Decoursey i Buggy, 1986)

La integritat dels NSQ està altament relacionada amb l'expressió dels ritmes, ja que les oscil·lacions circadianes es generen als NSQ, la fase de les oscil·lacions està relacionada amb la fase dels ritmes manifestos i anatomicament els NSQ estan situats per rebre inputs fòtics per sincronització i influències de les funcions neuroendocrines.

1.2.1.1.- Anatomia

Els NSQ són dos petits nuclis situats a la base del tercer ventricle, a l'hipotàlem anterior, i dorsalment al quiasma òptic. La seva forma varia segons l'especie (clocks). Les seves cèl·lules estan molt agrupades i són més petites que en altres zones del cervell. S'han descrit dos grups principals de cèl·lules. Un d'ells a la part medial del nucli, format per cèl·lules molt juntes agrupades en clusters. L'altre a la part lateral i ventral del nucli format per cèl·lules esfèriques situades a les parets dels vasos sanguinis que travessen els NSQ: Això suggereix que puguin ser cèl·lules neurosecretores que envii substàncies a la sang que aniran directament al teixit diana o que puguin actuar com a receptors hormonals sensitius.

Els dos nuclis estan interconnectats, havent-hi en cada nucli gran quantitat de circuits locals.

Als NSQ de la rata s'ha descrit dos tipus de sinapsis: Tipus I, amb densitat postsinàptica elevada, que és excitadora i tipus II, sense densitat postsinàptica, que és inhibidora. Quan les rates es troben sota LL hi ha

una disminució de material postsinàptic, mentre que en DD es troba el contrari (de Meijer, 1989). La resposta a la llum dels NSQ augmenta cap el dia 21 de vida, el que correspon a un increment de la densitat de les terminacions del TRH als NSQ (2ona-3^a setmana).

Dins dels NSQ hi ha una quantitat important de cel·lules glials, astròcits, que es suposa que tenen un paper en la generació dels RC, però que encara no està ben determinat.

Els NSQ reben informació dels cicles de llum-foscó externs, des de la retina per dues vies diferents:

- El Tracte retinohipotàlmic (TRH), que és específica per aquesta informació formada per prolongacions de les cel·lules ganglionars que projecten directament als NSQ. El TRH és suficient per mantenir l'entrenament encara que es destrueixin altres rutes visuals. El TRH no està present fins al dia 4 de vida de l'animal i els NSQ incrementen la seva resposta a la llum durant els primers 21 dies de vida, això correspon a l'increment de densitat a les terminacions del TRH als NSQ.
- A través del tracte òptic normal, pel feix intergeniculat que prové del nucli geniculat lateral formant el tracte geniculohipotàlmic (TGH). A l'IGL de la rata hi ha dos tipus de neurones, una es caracteritza per GABA i encefalines i projecta exclusivament al IGL contralateral. L'altre té GABA i NPY i projecta predominantment sobre els NSQ a través del TGH. El sistema IGL respon a la llum de manera que sembla que la acció tònica de la llum és parcialment mediada pel TGH.

De tota manera, l'activació del sistema IGL-TGH produeix canvis de fase diferents als que s'observen per la llum, avanços durant el dia subjectiu i retrassos durant la nit subjectiva. Això sembla ser un mecanisme de regulació per retroacció de la funció de l'oscil·lador especialment mitjançant els efectes de l'AM. Semblaria que el paper del IGL seria integrar la informació no-fòtica amb la fòtica i procurar una regulació homeostàtica de la funció de l'oscil·lador (Moore, 1992).

Els NSQ reben aferències d'altres parts del cervell, per exemple de l'hipotàlem lateral, l'àrea preòptica, els nuclis paraventriculars, els nuclis talàmics, D'entre elles està força ben estudiada la que prové del Rafe,

amb serotonina com a neurotransmissors. Tot i que el seu paper no és encara massa ben delimitat.

1.2.1.2.- Neuroquímica dels NSQ

S'han identificat gran nombre de NT però el seu paper encara no es coneix gairebé.

- NT d'origen intrínsec als NSQ: Vasopressina, neurofisina, somatostatina, bombesina, PIV i GABA entre els més importants.
- NT d'origen extrínsec: serotonina (del rafe), NPY (del IGL), Glutamat i aspartat (del TRH), dopamina, adrenalina, noradrenalina, prolactina, colecistoquinina, substància P i d'altres de menor importància.

Les neurones que contenen vasopressina que estan localitzades exclusivament a la part rostral i dorsomedial. Les que contenen PIV a la zona ventrolateral i les que contenen GABA, somatostatina, substància P es troben per tot els NSQ.

Cal destacar l'elevada presència de GABA, el que suggereix que una gran part de l'interacció local és deguda a circuits inhibitoris. L'administració perifèrica d'agonistes i antagonistes gabèrgics poden produir canvis de fases dels RC. (Per recull bibliogràfic sobre NT i la seva distribució dins dels NSQ veure Meijer i Rietveld, 1990, Rietveld 1992, *The clocks mind*).

Recentment s'han descrit factors d'expressió genètica, molts d'ells influïts per l'estimulació de la llum a fases crítiques del ritme de l'animal. Per exemple l'expressió del gen c-fos que incrementa pels mateixos pulsos de llum que produeixen canvis de fase (Rea, 1989).

Pel que fa a les eferències dels NSQ cal comentar que són moltes, més difícils d'estudiar i que cal relacionar-les amb el control de les diferents conductes (per revisió veure, Meijer i Rietveld, 1989, *The clocks mind*, 1992). D'una manera general podem comentar que hi ha aferències cap a l'àrea preòptica, on es regulen funcions circadianes com el balanç de fluids, la reproducció, la son o la termoregulació; cap a la zona subparaventricular que inclou l'hipotàlem anterior, els nuclis ventromedials (NVM) i els nuclis paraventriculars (NPV). Els NVM fan

conexions amb l'hipotàlem i el septe de l'amígdala el que donaria lloc a RC en les funcions conductuals, conducta sexual, etc. Els NPV són un centre integratiu relacionat amb els processos de conducta, dels processos del sistema nerviós autònom i del sistema neuroendocrí. Un grup de neurones influeix en la secreció de la hipòfisi el que produiria RC en la secreció hormonal.

Altres eferències dels NSQ van a la glàndula pineal.

1.2.1.3.- Resposta a la llum dels NSQ

Les neurones dels NSQ presenten una activitat elèctrica espontània segons un ritme circadiari. Un 73% de les neurones dels NSQ de la rata incrementen la seva activitat espontània en front d'un increment a la intensitat de llum. Les altres disminueixen la seva activitat en resposta a la llum. Quan hi ha una variació de la intensitat de llum, les cèl·lules responen segons les seves característiques però a un cert nivell de intensitat arriben a la seva saturació. Per tant dins d'uns certs marges d'intensitat de llum els animals poden codificar la il·luminació que reben.

Els nivells de resposta a la llum varia segons la espècie, en rates va des de 0.1 lux fins a la saturació que es produeix aproximadament als 500 lux. Tenint en compte que les intensitats de llum a la natura van fins a $5 \cdot 10^5$ lux, la resposta del NSQ té lloc entre intensitats que apareixen a l'alba i al capvespre, per tant les cèl·lules dels NSQ diferencien entre dia i nit però no entre nits clares i fosques o dies de sol brillant o nuvolats. Els NSQ responen a les transicions entre llum-foscor.

Les lesions als NSQ en hamsters produeixen tota una sèrie de patrons de conducta que reflexen l'expressió d'un nombre d'oscil·ladors dissociats un de l'altre. Potser hi ha 7 altres oscil·ladors fora dels NSQ que estan sotmesos a la jerarquia dels NSQ.

Segons Moore (1982) les cèl·lules dels NSQ són inicialment formades segons una colla de oscil·ladors independents genèticament determinats que es tornen independents durant el desenvolupament, de manera que cada neurona funcioni com una part d'una xarxa d'oscil·ladors.

1.2.2.- ALTRES ELEMENTS: GLANDULA PINEAL

La glàndula pineal a la rata està situada a l'intersecció que formen els dos hemisferis cerebrals amb el cerebel. Es una estructura globular, d'un mm aproximat de diàmetre unida per un peduncle... La pineal de tots els animals secreta melatonina segons un ritme circadiari amb el màxim a la fase nocturna. La llum inhibeix la síntesi i secreció de melatonina. En mamífers el RC de secreció de melatonina depèn de la integritat dels NSQ.

La melatonina és sintetiza als pinealòcits a partir del triptofan. En la seva síntesi intervenen dos enzims principals, la N-acetil transferasa (NAT) i la Hidroxi-indol-O-metiltransferasa (HIOMT). L'activitat de la NAT és qui segueix un ritme circadiari directament depenent dels NSQ.

La melatonina surt dels pinealocits cap a circulació sistèmica, sent la concentració de melatonina en sang un reflex de la activitat de la pineal. La pineal reb influències desl NSQ per via indirecta. Dels NSQ hi ha eferencies al nucli paraventricular de l'hipotàlem, d'aquí al gangli cervical superior i d'aquí surten fibress simpàtiques que arriben als pinealòcits i acaben en receptors beta 1.

La pinealectomia no afecta el tau de les rates quan es mantenen en condicions de DD (Cheung i McCormack, 1982), però si que fa que els animals pinealectomitzats resincronitzin més ràpidament a canvis de fase del fotoperíode que els animals control. Això ha estat interpretat per Aschoff et al (1982) com a un increment de la sensibilitat als efectes de *masking* de la llum dels animals pinealectomitzats més que no pas una alteració de les propietats de canvis de fase del sistema.

Tot i que sembla ser que la pineal no és una part integral del sistema oscil.lador en les rates, pot tenir un efecte de retroacció sobre els oscil.ladors dels NSQ per tal de mantenir una estabilitat del ritme, període o fase. Així l'administració de melatonina diària sincronitza el RAM de la rata (Redman et al, 1983; Cassone et al 1986a), i aquesta sincronització depen dels NSQ, ja que animals amb lesions al NSQ són insensibles a aquesta hormona (Cassone, 1986b). També la melatonina afecta a l'activitat metabòlica i elèctrica dels NSQ in vivo (Cassone, 1987). A més als NSQ s'ha trobat receptors de melatonina d'alta afinitat (Weaver et al 1989).

La glàndula pineal té importància en la mesura del fotoperíode i en la adaptació fisiològica a l'època del creixement de les cries amb el període climàtic més adient.

1.2.2.1.- Efectes de retroacció sobre els NSQ

A més de l'acció de la melatonina sobre els NSQ modulant la manifestació dels ritmes hi ha altres factors que actuen modificant el pacemaker. Un d'ells és l'activitat motora. S'ha descrit que l'activitat motora sincronitza el ritme circadiari de hamsters....

Cal tenir present que qualsevol sistema de retroacció a l'organisme és un oscil·lador secundari potencial. Si el pacemaker pot fer un input al cicle, l'oscil·lador secundari pot adquirir un període circadiari i ser part del programa temporal que dirigeix el pacemaker (Pittendrigh 1981a).

1.3.- DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA CIRCADIARI

Els NSQ de les rates provenen de la matriu germinal diencefàlica entre els dies 13 i 17 de vida embrionària. El primer ritme que apareix és el de consum de glucosa, tant in vivo com in vitro, que apareix sobre el dia 19 (Reppert i Schwartz 1984). A aquesta edat hi ha encara molt poques sinapsis i aparentment no hi ha connexions intrínseques o extrínseques. Les sinapsis inmadures apareixen cap al dia 18 postgestacionals i la majoria de sinapsis es formen en el període postnatal.

El TRH comença a ser funcional sobre el dia 4 postnatal i al dia 6 ja hi ha entrainment per la retina

Està demostrat que els RC de la mare sincronitzen el pacemaker de les cries, però l'entrainment no és essencial pel normal desenvolupament del pacemaker. Així per exemple les cries presenten en néixer una sincronització de fases dels seus ritmes, mentre que això no succeeix quan a les mares s'els hi ha lesionat els NSQ. En aquest segon cas les cries individualment presenten ritmes normals, però no presenten sincronia entre ells.

En rates apareixen primer els ritmes associats amb el menjar (increment de pes) després els ritmes en la pineal i sistema nerviós

central, a continuació els ritmes endocrins controlats per la hipòfisi i per últim els ritmes en conductes voluntàries tals com beguda, AM ,... (Davis 1981).

Les característiques del desenvolupament dels ritmes són l'increment d'amplitud del ritme circadiari, la modificació del tau i de la forma, fins arribar a les característiques propies de l'animal adult. Així per exemple el ritme d'activitat de la NAT de pineal apareix sobre el dia 4 postnatal, i incrementa la seva amplitud fins aproximadament el dia 10. El ritme de cortisol apareix sobre el dia 18 postnatal però varia en forma, amplitud i fase fins a la pubertat.

Ja que l'activitat dels NSQ es manifesta en període preanatal i no encara els ritmes manifests, cal pensar que la maduració es seqüencial als canvis de sortida o mecanismes de control distants al pacemaker.

També les condicions ambientals poden afavorir o retrasar l'aparició dels RC. Així (Cambras i Díez 1990) sota condicions de LL es presenta un retràs en la aparició del RAM comparat a l'evolució sota condicions de DD o LD, podent ser tant per l'efecte inhibidor de la llum com per la conducta arritmica de la mare en aquestes condicions.

1.3.1.- INFLUENCIA DE LA EDAT SOBRE ELS RC

Hem vist com el RC d'adult es desenvolupa a partir de la presencia de ritmes ultradiaris en l'animal jove. En l'edat adulta el patró del ritme és constant fins a la vellesa. Quan l'animal envelleix el pacemaker funciona més depresa, el que comporta un escurçament de tau, a més s'observa una disminució de l'amplitud del RC, que pot desaparèixer, i un increment dels ritmes ultradiaris. Igualment s'han descrit casos de desincronització interna i pèrdua de la capacitat d'entrainment.

1.3.2.- INFLUENCIA DE LA LLUM SOBRE ELS RC

La llum afecta el RC per la durada del pols de llum, per la intensitat de la llum, la longitud d'ona (la llum vermella és la que menys inhibeix la secreció de melatonina), i atenent a la fase circadiana del pols de llum.

La llum constant té molts efectes sobre els RC:

- Produeix variacions del tau segons les regles d'aschoff (1965). Per exemple en rates el tau en DD és de 24.1 hores mentre que en LL pot ser fins a 25.9 hores.
- A llarg termini es produeix arritmicitat o perdua del component circadiari i predomini dels ultradiaris (Honma i Hiroshige, 1978).
- Pot produir *splitting* o desicronització interna (Boulos i Terman, 1979)...

Altres efectes fisiològics que produeix la llum constant són l'aparició d'estre permanent en les femelles (Fiske 1941), dany retinal i alteració de l'activitat enzimàtica de la pineal (Axelrod et al, 1965), no permanent-se la reproducció en algunes espècies.

La intensitat de llum és un dels factors que més influeix el tau dels animals.

1.4.- RITME D'ACTIVITAT MOTORA

Indica moviment general de l'animal. Cal tenir en compte que es tracta d'un ritme manifest. Reflexa el funcionament del rellotge, però no exclusivament, ja que pot venir afectat per altres factors, entre ells alguns de naturalesa homeostàtica.

Pittendrigh i Daan (van postular que el RAM ve governat per dos oscil·ladors, un de matins i altre de vespre que en determinades circumstàncies es poden dissociar i adquirir diferents relacions de fases entre ells.

El RAM acostuma a presentar un patró bimodal característic a la rat. Pittendrigh i Daan van suggerir que aquesta bimodalitat era una propietat persistent del sistema circadiari. Implica dos pics d'activitat un a l'inici de la fase de foscor i l'altre al final que reflexarien la presència dels dos oscil·ladors E i M tots dos sensibles a la llum.

1.5.- ACOBLAMENT

En l'estudi dels ritmes pot haver-hi acoblament a diferents nivells. Considerant un sistema multioscil.latori, es pot descriure acoblament entre les unitats (oscil.ladors individuals) que formen els oscil.ladors propiament dits; entre els diferents oscil.ladors, el que genera el ritme endògen propiament, o en el cas contrari el fenòmen d'*splitting*, i per últim l'acoblament entre les senyals externes i els ritmes ("entrainment").

1.6.- ORGANITZACIO DEL SISTEMA CIRCADIARI

1.6.1.- Sistema multioscil.lador

El sistema circadiari està format per diferents components. Ha de estar format per un sistema oscil.lador que generi els ritmes espontaniament, per vies d'acoblament i pels elements passius, que són estructures que generen ritmes com a conseqüència de les senyals de l'oscil.lador. Aquests elements passius són els que generen els ritmes manifests. Els ritmes manifests són els que es poden mesurar. Tot i que el ritme manifest reflexa l'activitat de l'oscil.lador, el reflex no és exacte. El ritme manifest pot ser modificat per altres factors que no afecten el sistema oscil.lador.

Actualment és considera ja plenament que el sistema circadiari és un sistema multioscil.lador, format per múltiples oscil.ladors circadianis que el seu acoblament és crític per la organització temporal de la fisiologia i la conducta. Sembla ser que el sistema circadiari de mamífers estaria format per oscil.ladors tant jerarquitats com en paral.lel (oscil.ladors de la mateixa jerarquia). Als NSQ es trobaven els oscil.ladors principals. Aquesta població d'oscil.ladors actuaria en sincronia. Si per algun motiu no hi ha sincronia apareixen diferents patrons en la conducta dels animals.

Una de les alteracions que es poden presentar com a conseqüència de la dissociació entre oscil.ladors és el fenòmen de *splitting*, o dissociació. Consisteix en que el ritme d'activitat de diverses espècies d'animals es disocia en diversos, normalment dos, components després de molt temps en LL (Boulos,...). El *splitting* es pot obtenir per intensitats de llum elevades o per canvis de nivells hormonals, per exemple en el cas de l'estornell per administració de testosterona.

També la presència de components ultradiaris reflecteix un sistema multioscil·lador. Quan els animals es tornen arrítmics, apareix gran quantitat de components ultradiaris, per tant sembla que les diferències entre *splitting* i ritmes ultradiaris no es tan qualitativa sino quantitativa (Rosenwasser i Adler, 1986).

Encara que l'animal manifesti un ritme estable, sota LD o sota DD, els patrons que presenta són també complexos i presenten múltiples subcomponents rítmics. Aquests components es solen manifestar en algunes fases del ritme circadiari (Davis i Menaker, 1980). Quan es lesionen els NSQ i apareixen patrons arrítmics es podria pensar que es treuen la presència d'aquestes finestres i així els ultradiaris es poden presentar durant totes les fases del ritme circadiari.

Cada oscil·lador del sistema oscil·lador es podria considerar formada per suboscil·ladors que podrien estar format per clusters de neurones amb activitat circadiana autònoma, que mantenen una comunicació entre elles formant una xarxa de neurones. L'atracció entre els oscil·ladors podria venir donat tant per factors externs com interns. Majoritàriament aquests clusters podrien estar situats als NSQ (Díez).

Un model en el que intervenen dos oscil·ladors és el proposat per Pittendrigh i Daan (1976) que considera que el RAM ve regulat per dos oscil·ladors un seria sensible a l'inici de llum (oscil·lador M de l'anglès "morning") i l'altre a l'inici de la foscor (oscil·lador E, de l'anglès "evening"). L'oscil·lador E és més lent, té una freqüència més baixa, que el M.

Degut a la complexitat del sistema oscil·lador és necessari recórrer a al modelització i a la simulació per ordinador. En aquest cas potser no tenim una realitat anatòmica però si que podem aconseguir una predicció de com respondrà l'animal en front a diferents estímuls o condicions ambientals.

Matemàticament es pot considerar que les oscil·lacions circadianes corresponen a "cicles límit" (..). Segons això un agent, per exemple una senyal lluminosa, que modifiqui la trajectòria normal del cicle modificant la velocitat del procés, sol afectar enlentint el procés en una fase i accelerant-lo a una altre. D'aquesta manera hi ha una compensació per estabilitzar el cicle. Els cicles que millor responen són els asimètrics (Díez 1993). Tot i que moltes de les hipòtesis utilitzen els cicles límits per

explicar tant la presència de ritmes circadianis com ultradianis, actualment s'han incorporat a al modelització per ordinador els sistemes oscil·ladors caòtics, que donen una llum nova a les idees sobre els ritmes biològics.

1.6.2.- INFLUÈNCIA DEL SEXE

L'estradiol produeix avanç significatiu de l'inici d'activitat en animals mantinguts sota LD (Morin et al, 1977). Els estrogens produeixen diferències de τ en rates i hamsters. Conductualment sembla que l'inici d'activitat de les femelles la nit del proestre així com un nivell general d'activitat incrementa les probabilitats de la femella d'entrar en contacte amb una parella potencial.

La castració de ratolins produïa un increment del tau en AM i la testosterona reverteix aquests efectes.

Si les hormones gonadals tenen un paper en la organització circadiana, hi ha també la possibilitat que el sistema circadiari estigui organitzat de manera diferent en mascles i femelles. Zucker et al (1980) va indicar que el sistema circadiari del hamster estava sexualment diferenciat.

Els marges i el patró d'encarrilament a LD són diferents entre mascles i femelles. Aquestes diferències no depenen tant dels esteroides gonadals d'adult però sí de les hormones perinatales. (Turek i Gwinner, 1982).

2.- MATERIAL I MÈTODES

2.1.- ANIMALS

En tots els experiments s'han fet servir rates albines Wistar. Quan s'han utilitzat animals joves, aquests s'obtenien a partir de les mares amb les seves corresponents ventrades, les quals eren posades en les condicions requerides per cada experiment abans del dia del deslletament (dia 24 d'edat). En els altres casos es partia d'animals adults els quals passaven un temps d'acostumament (més d'una setmana) a les noves condicions experimentals. Els detalls específics de cada disseny es comenten als respectius experiments.

2.2.- CONDICIONS DE MANTENIMENT

Durant el curs dels experiments els animals estaven col·locats en gàbies individuals, transparents de Makrolom^r, amb unes mides de 25x25x14 cm. La distribució de gàbies en les cabines d'observació depenia de cada experiment, però en cap cas es va superar el número de 12 gàbies per cabina. Les cabines d'observació formen part de la unitat d'experimentació del Grup de Cronobiologia de la Facultat de Farmàcia de Barcelona.

El conjunt de la unitat d'experimentació consta d'un passadís central totalment fosc, només il·luminat per dos petits pilots vermells, al que s'obren 8 cabines. L'estructura de la unitat d'experimentació assegura la total independència pel que fa a les condicions ambientals, entre les diferents cabines.

L'accés a la unitat només és possible a través d'una porta amb clau, de manera que ningú pogués entrar mentre s'estava treballant a l'interior. La unitat estava totalment insonoritzada, i les condicions de llum de les diferents cabines eren controlades de forma totalment independents.

Fora de la unitat d'experimentació es trobaven els aparells de registre de dades, per tal de no molestar innecesàriament als animals.

A cada cabina es controlava la temperatura, la humitat, i la intensitat de la llum per tal que aquestes 3 variables fossin el més

uniforme possible. Cada cabina estava proveïda d'un termòmetre que mesurava tant la temperatura en el moment d'enregistrar les dades, com la màxima i la mínima des de que es va fer l'últim registre. Les temperatures enregistrades van oscil·lar entre 20-24 graus. Amb el mateix aparell es podia controlar la humitat, també com en el cas de la temperatura la humitat actual, la màxima i la mínima, i es van obtenir uns comptatges entre el 40 i el 60%. La intensitat de llum es controlava, de manera esporàdica, tant durant la fase de llum com a la de fosc (per comprovar que no haguessin variat les condicions d'il·luminació).

Durant les fases en condicions de fosc, hi havia una dèbil bombeta de incandescència de color vermell que proporcionava una il·luminació d'intensitat inferior als 0.4 lux. Durant les fases de llum, la il·luminació procedia de dos fluorescents situats verticalment a la paret, per tal que la llum que arribés a cada gàbia fos el més similar possible. Pel mateix motiu, els fluorescents, per la seva cara externa estaven protegits per un dispositiu, que impedia la llum directa a les gàbies, que hagués afavorit una arribada de llum intensa a les gàbies més properes al fluorescent. Amb aquest dispositiu la llum que arribava a cada gàbia era indirecta i uniforme en tota la cabina. En els experiments en que s'havien d'obtenir nivells d'il·luminació concrets, això es feia col·locant els fluorescents sobre un prestatge per sobre dels que si trobaven les rates i mirant cap el sostre. Un cop en aquesta posició es col·locaven unes peces allargades de fusta en forma d'U que cubrien una part de cada tub. D'aquesta manera es podia ajustar el nivell d'il·luminació a base de posar més o menys peces i variant la seva disposició sobre els tubs fluorescentes.

El fons de les gàbies estava recobert per encenalls i el sostre estava constituït per una reixa d'acer inoxidable amb el pinso i el biberó ple d'aigua. Els animals en tot moment tenien lliure accés al menjar i a l'aigua de beguda. En el primer experiment es va fer servir aigua mineral envasada, per tal d'evitar possibles canvis en la concentració dels ions. Als demés experiments es va utilitzar aigua de la xarxa.

2.3.- APARELLS

2.3.1.- DETECCIÓ DE L'ACTIVITAT MOTORA

Per mesurar l'activitat motora dels animals es van utilitzar actímetres de feixos infrarojos (IR) construïts al nostre Departament. Aquests aparells es basen en dos feixos IR perpendiculars que es tallen al centre del dispositiu. Per aquest mètode cada vegada que l'animal, en moure's, travessa un dels feixos es genera un comptatge (un impuls TTL de 5 V), que és enregistrat per un ordinador que hi ha connectat a l'actímetre. Els rajos infrarojos són invisibles pels animals utilitzats i no interfereixen amb la llum ambiental. Els feixos de llum quedaven a uns 3 cm per sobre del terra de la gàbia, de manera que els encenalls no interferissin amb els feixos.

Els comptatges generats pels animals eren registrats en diferents ordinadors, un per cada cabina, que estaven situats a fora de la unitat d'experimentació. D'aquesta manera es podia controlar el funcionament de l'ordinador sense interrompre les condicions de manteniment. Tots els ordinadors eren del tipus PC-286, però sense disc dur. Es van utilitzar disquets de 360K, per a recollir les dades, per dues raons: a) el dispositiu mecànic tant sols treballa durant el moment que es realitza la gravació, i b) al ser disquets de molt poca capacitat, en cas d'una avaria la pèrdua d'informació és sempre menor que en el cas d'utilitzar dispositius de més gran capacitat.

Per condicionar els impulsos provinents del conjunt d'actímetres de cada cabina i procedir al seu comptatge, es va utilitzar una tarja Input/Output tipus ***, i un programa desenvolupat al propi Departament (SAD), que permet controlar un total de 24 entrades TTL. Les freqüències de mostreig han estat de 10 o 15 minuts segons els experiments.

2.3.2.- CONTROL DE LA ILUMINACIÓ

La connexió i desconexió dels diversos grups de fluorescents de cada cabina es realitzava a través d'un conjunt de vuit programadors digitals (tipus ***) corresponents a cada una de les vuit cabines.

Al darrer experiment, en el que els patrons d'il·luminació eren força complexos, es va incorporar un fotodetector, a l'interior de cada cabina. Aquest sistema produïa una seqüència regular d'impulsos, la freqüència dels quals era proporcional a la intensitat de la il·luminació. Aquest impulsos eren enregistrats en un dels canals d'entrada de dades, com si es tractés d'un altre actímetre. D'aquesta manera en el mateix arxiu de dades generat pel programa DAS s'incorporava una columna de dades referent a les condicions d'il·luminació, totalment sincronitzada amb el registre d'activitat motora.

2.3.3.- CONTROL DE LA TEMPERATURA

Als dos darrers experiment es va incloure, junt amb el sensor d'il·luminació, una sonda de temperatura, que també produïa una freqüència d'impulsos proporcional a la temperatura. El registre de dades es va de la mateixa manera que s'ha explicat en el punt anterior.

2.4.- PINEALECTOMIA

2.4.1.- PINEALECTOMIA EN NADONS

Es va realitzar quan els animals tenien 2 dies d'edat. Es procedeix a anestèsia dels animals mitjançant hipotèrmia a base de posar-los sobre un recipient amb gel trinxat durant uns dos minuts. Amb unes tisores de punta fina es fa un petit tall longitudinal en el cartílag cranià entre mig de les dues orelles. Amb un parell de pinces corbes de punta fina es separen els costats del tall i es localitza fàcilment la glàndula pineal entre els dos hemisferis cerebrals i per sobre del cerebel. Es retira la glàndula per dissecció roma del seu peduncle que s'agafa amb les pinces.

Cal tenir cura del manteniment de l'anestèsia durant tot el procés ja que si aquestes operacions es realitzen de forma precisa i ràpida, no es produeix gaire hemorràgia, degut a la hipotèrmia de l'animal.

Finalment es tenquen els llavis de la ferida i es realitza un punt de sutura. Després es posen els animals sota una làmpara (60 W) per tal de facilitar el seu retorn a la temperatura normal. Cal tenir cura d'evitar taques de sang o un "acabat" que podés provocar el rebuig de la mare.

2.4.2.- PINEALECTOMIA EN ANIMALS ADULTS

Es procedeix a anestessiar els animals mitjançant inhalació d'eter. Un cop anestessiat es col·loquen sobre un dispositiu estereotàxic, amb la finalitat de lograr una perfecta fixació del cap.

Un cop col·locats en el dispositiu s'ha seguit la tècnica descrita per Reiter (***). Aquesta tècnica consisteix (de forma resumida) en realitzar la trepanació del crani amb una broca especial en forma de got sobre el punt lambda. A continuació s'incideix amb unes pinces fines a través de les meninges del sinus cranial, per tal d'agafar la glàndula pineal per la part del peduncle. Durant aquesta operació es normal que es produeixi una forta hemorràgia. Per això cal tenir una certa pràctica en trobar la glàndula i procedir amb rapidesa. A continuació es col·loca el disc ossi resultant de la trepanació i es cus la pell amb un parell de punts de sutura.

2.4.3.- ANIMALS DE REFERÈNCIA: *SHAM*

Aquests animals van ser manipulats idènticament que els animals pinealectomitzats, amb la única diferència de que no es va procedir a l'extirpació de la glàndula pineal.

2.4.4.- VERIFICACIÓ DE LES PINEALECTOMIES

Un cop acabats els experiments es va comprovar la correcta extirpació de les pineals mitjançant la necròpsia de tots els animals. Aquesta verificació es va realitzar també amb els animals de referència (*Sham*), per tal de comprovar que no s'havien produït altres lesions. Les necròpsies es van realitzar sense que l'operador conegués la identitat dels animals, per tal que l'assaig fos cec.

2.5.- TRACTAMENT I ANÀLISI DE LES DADES

Un cop enregistrades les dades en disquets de 360K, aquestes eren transferides a un disc dur de gran capacitat, per tal de reunir-les en arxius compactes corresponents als diferents experiments. Un cop reunides les dades es procedia a la seva anàlisi utilitzant diverses tècniques gràfiques, analítiques i estadístiques. Algunes d'aquestes tècniques són d'aplicació exclusiva en Cronobiologia i d'altres són d'àmbit

més general. Per tal de procedir al seu comentari, proposem la següent classificació:

- Mètodes específics de Cronobiologia
 - Mètodes gràfics
 - Doble gràfica (*double plotted graph*)
 - Matrius gràfiques
 - Tractament gràfic d'imatges ("agregats")
 - Anàlisi de periodicitats
 - Periodograma de Sokolove-Bushell
 - Anàlisi de Fourier (anàlisi espectral)
 - Caracterització del ritme
 - Anàlisi del cosinor
 - Forma d'ona
 - Quantificació del soroll
 - Índex de constància del patró (ICP)
 - Índex d'activació / desactivació (IA/D)
 - Increment de l'activitat prèvia a la foscor
 - Càlcul de les fases de sortida
 - Interacció de ritmes
- Mètodes generals (estadístics)
 - Regressió lineal
 - Regressió no lineal
 - Anàlisi de la variança de models lineals
 - ANOVA
 - t Student
 - F Snedecor)
 - Anàlisi multivariant de la variança (MANOVA)

2.5.1.- DOBLE GRÀFICA

La doble gràfica ("double plotted graph") és un dels mètodes de representació gràfica de les dades que més s'utilitza en Cronobiologia, per visualitzar el ritme d'una variable. La seva estructura és un seguit de files posades una sota l'altra, en les que cada fila representa l'activitat d'un dia o cicle. Si l'animal presenta una pèriodicitat igual a 24 hores (o a la durada del cicle), s'observarà que la fase d'activitat comença i acaba cada dia a les mateixes hores. Això fa que a la gràfica aparegui l'activitat formant una columna vertical fosca. Si el període és més llarg la columna es va desplaçant cap a la dreta degut al retard diari de la fase d'activitat. Si el període és més curt el desplaçament és cap a l'esquerra. Per tal de millorar la visualització dels components que do es desenvolupen verticalment, aquesta gràfica es fa per duplicat, posant una al costat de l'altre. D'aquesta manera cada fila de la gràfica correspon a un període de 48 hores.

Generalment les dobles gràfiques es fan utilitzant com a base per a definir cada fila, un període de 24 hores. En certs casos es convenient utilitzar altres valors per tal de facilitar la visualització d'alguns components. Així quan es fa una doble gràfica amb mòdul n hores, els components amb un període igual a n seran els que apareixeran disposats verticalment.

2.5.2.- MATRIUS GRÀFIQUES

Mitjançant aquesta tècnica es visualitza l'evolució dels diferents components de freqüència presents en un ritme circadiari, al llarg del temps (**). Cal calcular els espectres de potència diaris d'un registre llarg d'activitat. Quan es tracta d'animals en curs lliure, els dies es defineixen com a dies circadials de durada igual a τ (no 24 hores). A fi de normalitzar els espectres, aquests s'han d'expressar en percentatge de la potència total de cada cicle. Un cop es disposa de tota la sèrie d'espectres, aquests es representen gràficament sobre una quadrícula imaginària en la que cada fila representa un dia i les columnes corresponen als diferents harmònics d'esquerra a dreta. A cada casella es dibuixa un nombre de ratlles proporcional a la potència del corresponent harmònic i dia.

Es poden realitzar matrius gràfiques mitjanes, representant en cada casella la mitjana de les potències obtingudes en diversos animals per a

un mateix dia i harmònic. Finalment també és possible realitzar "suavitats", mitjançant mitjanes mòbils en el sentit dels dies (vertical). Aquestes manipulacions resalten els principals trets en l'evolució dels espectres i eliminen les variacions espúrees.

2.5.3.- TRACTAMENT GRÀFIC D'IMATGES

Es tracta de manipular gràficament les dobles gràfiques per tal de resaltar els components rítmics i reduir tot allò que no representi un component real. Aquestes tècniques impliquen una forta manipulació de la informació, per això cal utilitzar-les amb força precaució i utilitzar sempre mètodes objectius que no perjudiquin el tipus d'informació que es vol obtenir.

Es parteix d'una imatge digital de la doble gràfica, en la que cada *pixel* correspon a una mesura d'activitat motora. El valor de cada *pixel* (i per tant el seu color) serà proporcional al nivell d'activitat en aquell punt de la gràfica. Aquesta imatge, composta per una gran matriu de punts amb valors entre 0 i 255, és tractada numèricament segons diferents algorismes, que calculen els nous valors de cada punt en funció de les característiques del seu entorn. D'aquesta manera es poden definir diferents manipulacions elementals, cada una de les quals té un efecte ben definit. Aquestes manipulacions poden ser utilitzades una a continuació de l'altre constituint una seqüència d'operacions, que constitueix un tractament específic de la imatge original. Aquests tractaments (o seqüències d'operacions) s'identifiquen mitjançant una sèrie de lletres, cada una de les quals correspon a una operació elemental.

A continuació indicarem breument les característiques de les diferents operacions que s'han utilitzat. El punt abans de l'operació serà x_0 , i els punts del seu entorn seran $x_1...x_8$, segons el següent esquema:

$$x_1 \quad x_2 \quad x_3$$

$$x_4 \quad x_0 \quad x_5$$

$$x_6 \quad x_7 \quad x_8,$$

el nou valor del punt x_0 dsprés d'una operació es representarà per x .

2.5.3.1.- Mitjana mòbil (M)

Realitza un suavitzat bidimensional. El nou valor serà la mitjana dels punts que es troben al seu voltant incloent el punt considerat. Equival a fer $x = (x_1 + x_2 + \dots + x_8) / 9$.

2.5.3.2.- Reducció (R)

L'efecte que produeix es equivalent a una disminució de les superfícies denses en funció de l'entorn. El nou valor serà el mínim valor dels punts que es troben al seu entorn. Equival a fer $x = \min(x_1, \dots, x_8)$.

2.5.3.3.- Equalització (Q)

Redefineix els punts de la imatge de tal manera que apareguin amb igual freqüència tots els nivells de colors. Per a fer això cal calcular un histograma de distribució de colors en el que n_c representa el nombre de vegades que apareix el color c en tota la imatge. A partir d'aquí es pot calcular la probabilitat d'aparició d'un color fent $p_c = n_c / N$, on N és el nombre total de punts. Els nous valors de cada punt vindran determinats per la següent transformació $x = 255 (p_0 + p_1 + \dots + p_{x_0})$.

2.5.3.4.- Agregació (A)

Fà que un punt incrementi o disminueixi el seu nivell en funció del seu entorn horitzontal. Aquesta variació s'aplica al seu veí immediat. L'efecte visual equival a enfosquir les zones denses i aclarir les que no ho són, obtenint una mena d'"esquelet" dels components del gràfic. Aquest procediment ha estat dissenyat en el nostre Departament, específicament per analitzar registres d'activitat motora.

Es comença calculant un factor $f_d = (x_1/1 + x_2/2 + \dots + x_n/n) / (1 + 1/2 + \dots + 1/n)$, on x_n representa el punt que es troba n llocs a la dreta de x_0 . Tot seguit es calcula f_e per als punts del cantó esquerre, de manera anàloga al cas anterior. Çun cop fet això el nou punt valdrà $x = x_0 + k (f_d - f_e)$, on k és una constant. En aquesta operació es modifica també el punt veí de la dreta o esquerra segons $(f_d - f_e)$ sigui positiu o negatiu respectivament. L'increment del veí és el mateix que el de x_0 , però de signe contrari, es a dir $k (f_e - f_d)$.

2.5.4.- PERIODOGRAMA DE SOKOLOVE-BUSHELL

S'ha utilitzat per a determinar el valor dels períodes dels ritmes d'activitat motora. S'ha utilitzat un programa desenvolupat al propi Departament (PSB de Cronobio-PC), que implementa el mètode original descrit per Sokolove i Bushell (***). El nivell de risc α global utilitzat per determinar la significació dels pics ha estat del 0.05. Cal recordar que, d'acord amb la correcció de Bonferroni cada pic és verificat amb un nivell de significació α / N , on N és el nombre de períodes assajats.

En molts anàlisis, la determinació del període, per aquest mètode, ha estat el pas previ a l'anàlisi espectral, per determinar el període de l'harmonic principal.

2.5.5.- ANÀLISI DE ESPECTRAL

Aquesta tècnica s'ha fet servir per a caracteritzar els patrons rítmics d'activitat en base als seus components de freqüència. Es basa en l'anàlisi de Fourier, mitjançant el qual qualsevol ona periòdica es pot descomposar en una suma de funcions sinusoidals de períodes submúltiples del període fonamental. Elevant al quadrat l'amplitud de cada un d'aquests harmònics s'obté l'espectre de potències de la funció, el qual equival a l'anàlisi de la variança de la forma d'ona en funció dels seus components harmònics.

Per tal de que l'amplitud de l'oscil·lació no afecti els espectres de potència, aquests s'han expressat com a tants per cent de la potència global de la funció. D'aquesta manera la potència de cada harmònic representa el tant per cent de variació explicada per l'harmònic corresponent.

Per a realitzar l'anàlisi de Fourier i el posterior espectre, s'ha fet servir un programa que implementa les fòrmules d'Euler (***). En la major part dels cassos les anàlisis s'han fet en base al període dominant obtingut amb el periodograma de Sokolove-Bushell.

2.5.6.- ANÀLISI DEL COSINOR

Consisteix en ajustar les dades experimentals a una funció cosinusoidal, pel mètode mínims quadrats. Per aplicar aquesta anàlisi és imprescindible coneixer el període de la funció. Amb aquest mètode es pot

determinar l'acrofase (moment del màxim de l'oscil·lació), el mesor (valor mitjà del ritme ajustat) i l'amplitud de l'oscil·lació.

Tot i que es tracta d'un mètode ampliament utilitzat presenta el greu inconvenient de que presuposa la forma sinusoidal del ritme que s'analitza, fet que no es produeix gaire sovint.

S'ha fet servir una adaptació del mètode descrit per Bingham et al.(***), i s'ha utilitzat fonamentalment per a determinar les acrofases i les amplituds dels ritmes.

2.5.7.- FORMA D'ONA

S'ha utilitzat per a caracteritzar el patró motor de cada animal. Quan es tracta d'animals encarrillats per un cicle de llum, el procediment consisteix en calcular, per a cada temps del cicle, la mitjana de tots els cicles del mateix animal en aquell punt. D'aquesta manera s'obté la forma d'ona mitjana característica de l'animal amb els seus errors estàndar.

Si es tracta d'animals en curs lliure, cal determinar primer el període endògen tau per tal de "seccionar" el registre en fragments repetitius. Un cop fet això es determina l'acrofase de cada cicle, per tal de fer coincidir tots els cicles, i a continuació es calculen les mitjanes de cada temps de forma similar al cas dels animals encarrillats.

Atès que la durada del cicle dels animals en curs lliure no és la mateixa per a tots els animals, les formes d'ona s'han representat en temps circadiari (24 hores circadianes = tau)

A partir de les formes d'ona individuals s'han calculat les formes d'ona mitjanes per a diferents grups d'animals. En tots els casos s'ha fet servir temps circadiari, per les raons abans esmentades.

2.5.8.- QUANTIFICACIÓ DEL SOROLL

Es pot considerar que els harmònics de freqüències altes participen poc en la definició del patró circadiari d'un ritme. Això ho demostra la poca potència que normalment s'hi troba en aquests components. Així doncs s'ha considerat que a partir de l'harmònic 10 es tracta de "soroll", entenent aquest soroll com la part de potència que no queda clarament definida per la forma de l'ona.

Per al càlcul d'aquest soroll s'ha determinat la potència continguda en els deu primers harmònics i sha restat de 100. D'aquesta manera, quant més proper al 100% sigui aquest valor més indefinit (o variable) serà el patró. Cas d'existir algun component de període inferior a 2 hores aquesta interpretació no seria correcta, però com que no se'n ha observat cap es vàlida per al nostre cas.

2.5.9.- ÍNDEX DE CONSTÀNCIA DEL PATRÓ (ICP)

Aquest índex l'hem definit per quantificar el grau de constància (o repetitivitat) d'un patró d'activitat motora al llarg del temps. Per al seu càlcul utilitza el mateix principi utilitzat per el periodograma de Sokolove-Bushell. Un cop conegut el període del ritme objecte d'estudi es procedeix a distribuir les dades en una matriu de tal manera que cada fila contingui un cicle complet, i per tant cada columna correspondrà a les mesures d'un temps determinat dins el cicle. L'índex proposat serà el cocient de la variabilitat entre columnes dividida per la variabilitat total de la matriu. Quan més elevat sigui aquest valor, més repetitiu serà el patró.

2.5.10.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ / DESACTIVACIÓ (IA/D)

Aquest índex l'hem definit per tal de caracteritzar el grau de brusquetat amb el que es produeixen les transicions entre les fases d'activitat i inactivitat dels animals. En certa manera indica el grau de semblança del patró d'activitat motora amb una ona quadrada (del tipus tot o res).

Per al càlcul d'aquest índex cal determinar prèviament la forma d'ona mitjana de cada animal, tal com ja s'ha descrit. Sobre aquesta forma dona es determina el temps que la funció es troba per sobre de $4/3$ del valor mitjà d'activitat motora (t_4), i el temps per sota dels $2/3$ del valor mitjà (t_2). L'índex es calcula amb el cocient t_4 / t_2 . Quant més petit sigui l'índex més graduals són les transicions i quant més proper a 1, més sobtades.

2.5.11.- INCREMENT DE L'ACTIVITAT PRÈVIA A LA FASE DE FOSCOR

Hem definit aquest valor per quantificar la conducta anticipatòria present en els animals, abans que s'apaguin les llums i comencin a moure's. La presència d'una elevada conducta anticipatòria (i per tant del

valor d'aquesta variable) indica la possible existència d'un oscil·lador encarrilable, ja que el animal manifesta canvis conductuals abans de que tingui lloc l'estímul.

Aquest índex determina el pendent de la gràfica d'activitat motora durant els 90 minuts previs a que s'apaguin els llums. Aquest pendent es calcula trobant la diferència entre l'activitat motora acumulada 45 minuts abans del canvi de llum i la dels 45 minuts anteriors.

2.5.12.- CÀLCUL DE LS FASES DE SORTIDA

Aquesta fase correspon a l'acrofase dels animals quan aquests son deixats en curs lliure, després d'haver estat sotmesos a alguna manipulació. Permet conèixer si durant el temps anterior al curs lliure, els seus ritmes estaven encarrilats per algun factor comú. Cas de ser així s'observaria una marcada proximitat entre les fases dels animals mantinguts sota les mateixes condicions.

Per al seu càlcul s'han determinat les acrofases dels 5 primers dies en curs lliure utilitzant el mètode del cosinor. A partir d'aquestes acrofases s'ha extrapolat l'acrofase del primer dia en curs lliure mitjançant una recta de regressió. Per tal d'uniformitzar el resultat sempre s'ha fet servir un període d'anàlisi de 24 hores, amb el que les fases queden referides a l'hora local. Això no representa cap problema en la interpretació, ja que el que es tracta de veure és la coincidència de fases i no pas el valor concret d'aquestes.

2.5.13.- INTERACCIÓ DE RITMES

L'anàlisi de la interacció entre dos components rítmics s'ha realitzat únicament amb els animals sota T22 i T23 del primer experiment. En aquest cas es tracta de comprovar si quan coincideixen els dos components, l'amplitud resultant és la suma de les amplituds de cada component o bé existeix una potenciació o una reducció de l'amplitud del ritme.

El mètode seguit es basa en sumar l'activitat motora durant la fase de llum, per a cada cicle i analitzar la seva evolució en funció del temps. En cas de que tant sols existís un sol component encarrilat per T, seria una constant. En el nostre cas la presència d'un segon component de període fa que aquest valor presenti increments periòdics cada cop que

coincideixen els dos components. El mateix raonament es pot aplicar a la fase de fosc, la qual també presentarà oscil·lacions però amb un nivell mitjà més elevat ja que aquesta fase correspon a la fase d'activitat dels animals. De qualsevol manera si la interacció fos estrictament additiva, les oscil·lacions presents en la fase de llum haurien de tenir exactament la mateixa amplitud que les de la fase de fosc. Per tant l'anàlisi es basa en determinar l'amplitud d'aquestes oscil·lacions mitjançant el mètode del cosinor i procedir a la seva comparació.

Com a complement de les tècniques anteriors, s'han emprat diversos mètodes estadístics d'ús general:

- Regressió linial: per a estudiar el grau de dependència linial existent entre variables quantitatives. En molts casos s'ha utilitzat la transformació logarítmica per tal de linialitzar les funcions.
- Regressió no linial: per a estudiar el grau de dependència entre dues variables, quan no es pot expressar de forma linial i es disposa d'un model matemàtic per a explicar-lo. El procediment es basa en ajust iteratiu que fa servir el mètode de Mardquart.
- Anàlisi de la varianza de models lineals: per a determinar com afecten diverses variables qualitatives i/o quantitatives a una altra quantitativa. Es tracta d'un procediment general que es pot utilitzar definint una matriu de disseny específica per a un experiment, o bé utilitzar algunes proves quan es tracta d'algunes situacions concretes: dissenys factorials (ANOVA), comparació de més de dos grups (F de Snedecor) i comparació de dos grups (t de Student).
- Anàlisi multivariant de la varianza: es tracta de realitzar l'anàlisi de la varianza d'un model linial que tracta d'explicar la variació de més d'una variable qualitativa de forma simultània en funció d'un grup de variables qualitatives i/o quantitatives. El procediment és una ampliació del utilitzat en el cas anterior, però utilitzant proves específiques com ara la lambda de Wilks. Resulta especialment adequat per a trobar si un determinat factor produeix canvis significatius en un conjunt de variables, quan aquests no són clarament visibles en cada una d'elles per separat.

2.6.- SOFTWARE

Per a la realització de molts dels càlculs anteriorment exposats s'han desenvolupat nombroses rutines i petits programes d'ordinador en llenguatge Turbo Pasca. A més, per a la realització dels gràfics i anàlisis de dades s'han fet servir els següents programes informàtics.

AF* (Cronobio-PC)	Anàlisi espectral (anàlisi de Fourier)
CSR*	Anàlisi del cosinor
CSS Statistica	Representació gràfica i anàlisi
DPC*	Representació en "double plot"
DPCO*	Tractament gràfic (agregats)
Lotus 1.2.3	Gestió i anàlisi de dades
MG*	Matrius gràfiques mitjanes
MGC*	Sortida de matrius gràfiques
MODLIN* (Lotus 1.2.3)	Anàlisi de models lineals
PSB* (Cronobio-PC)	Periodograma de Sokolove-Bushell
Sigma Plot	Representació gràfica

(*) Programes desenvolupats al propi Departament.

**3.- EXPERIMENT 1:
ESTUDI DE L'ACTIVITAT MOTORA DE RATES JOVES SITUADES EN
CICLES SIMÈTRICS DE LLUM/FOSCOR DE DIFERENT PERÍODE**

3.1.- OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest experiment consisteix en estudiar el desenvolupament del ritme circadiari d'activitat motora de les rates joves situades en cicles simètrics de llum/foscor de diferent període. Així mateix, estudiar la seva capacitat de sincronització als diferents T i les característiques del patró d'activitat motora que adquireixen.

3.2.- DISSENY

Amb data 5 de novembre de 1992 van arribar al laboratori 9 rates femelles Wistar cada una amb 10 cries mascles de 18 dies d'edat, provinents de Charles-River. Des del moment de la seva arribada els animals van ser mantinguts en cabines insonoritzades i a $22(\pm 2)$ °C de temperatura, amb dieta A03 Panlab i aigua Font Vella ad libitum. Inicialment els animals van ser sotmesos a un patró simètric de llum-foscor de 24 hores de període (inici de la llum a les 08:00, inici de la foscor a les 20:00; 300 Lux en la fase de llum, 0.25 Lux de llum vermella en la fase de foscor).

Quan les cries van assolir 25 dies d'edat van ser separades de les rates progenitores i se'n van seleccionar 84 a l'atzar, que van ser situades individualment en gàbies de Makrolom (25*25*14 cm) i agrupades en 7 grups de 12 individus. Cada grup va ser situat en una cabina diferent, mantenint-se les condicions, d'insonorització, temperatura, i dieta, i mantenint-se el cicle de llum/foscor de 24 hores de període fins a l'inici de la fase de foscor. A partir d'aquest moment va ser canviat el període del cicle de llum/foscor de les diferents cabines de manera que un grup d'animals va ser sotmès a cicle de 22 hores (T22), un a 23 hores (T23), un a 24 (T24), un a 25 (T25), un a 26 hores (T26), un a 27 hores (T27) i un a 28 hores (T28). En tots els cassos els cicles de llum/foscor es van mantenir simètrics, amb 300 Lux en la fase de llum i 0.25 en la de foscor. Els animals es van mantenir en aquestes condicions d'il.luminació durant 61 dies, i a partir d'aquest dia quan entraven en la fase de foscor restaven en foscor constant. Es va mantenir aquesta nova condició d'il.luminació durant 30 dies, finalitzats els quals es van sacrificar els animals.

En el moment en que es van tenir els animals situats en gàbies individuals i en les diferents cabines (és a dir, als 25 dies d'edat) s'inicià el registre de l'activitat motora de 6 animals de cada grup. El registre va durar fins al final de l'experiment. El motiu pel qual hi havia 12 animals per cabina és que simultàniament a aquest experiment s'estava realitzant un estudi de creixament dels animals en funció del període del cicle de llum fosc.

Per a la detecció de l'activitat motora es van utilitzar sensors de tipus òptic i es va utilitzar un interval de mostreig de 10 minuts.

3.3.- RESULTATS

3.3.1.- DOBLES GRAFIQUES A 24 HORES

Des de la Figura 1 fins la Figura 7 es poden observar les gràfiques DP individuals dels diferents animals en base a 24 hores, agrupats de manera que cada pàgina conté una situació experimental diferent (T22, T23,... T28).

L'observació d'aquests DP posa de manifest la presència en tots els animals d'un component circadiari d'activitat motora que segueix el cicle de llum/fosc al qual està sotmès l'animal.

En tots els animals pertanyents als grups T22 i T23 s'observa, a més a més, la presència d'un component circadiari no encarrilable per la llum amb període superior al període del cicle de llum al qual estan sotmesos els animals, i superior a les 24 hores. La presència d'aquest component és especialment clara quan coincideix amb la fase de fosc.

En els animals del grup T24 s'observa que durant el temps en el qual aquests estan sota el cicle de llum/fosc presenten un pic d'elevada activitat motora en l'inici de la fase de fosc, i una sèrie de components circadiaris a l'interior d'aquesta fase. En els animals #1 i #3 (** comprovar-ho) aquests components presenten, després d'aproximadament 10 cicles, una relació de fases estable amb el cicle de llum/fosc. En els animals #2 i #4 sembla que el període d'aquests components és lleugerament superior a les 24 hores (no s'estableix una relació de fases constant amb el cicle de llum/fosc). Finalment, en els animals #5 i #6

s'observa que el període del component endogen és clarament superior a les 24 hores, malgrat que només és present en la fase de foscó.

En totes les gràfiques dels animals del grup T24 s'observa que quan els animals són deixats en curs lliure la fase de sortida ve determinada pels components endogens, i que el pic d'activitat motora que es produeix en l'inici de la fase de foscó no té continuïtat en curs lliure.

En els DP dels animals del grup T25 posa de manifest que aquests són els que presenten un patró més estable, quedant molt ben definida la fase d'activitat i la fase de repòs.

En les gràfiques dels animals pertanyents als grups T26 al T28, i sobretot en aquest últim, s'observa que a més del component circadiari sembla que hi ha components d'alta freqüència (al voltant de 7 o 8 cicles cada 24 hores). En dos dels animals T27 (#1 i #2), s'observa també la presència d'un component circadiari independent al del cicle de llum/foscó, i amb període pròxim a les 24 hores i amb una fase alfa d'aproximadament 12 hores.

Es pot observar en totes les gràfiques que els animals de tots els grups presenten en el moment en que són deixats en curs lliure (en foscó constant) un component circadiari ben marcat i de període superior a 24 hores.

3.3.2.- DOBLES GRÀFIQUES A MÓDUL T

Des de la Figura 8 fins la Figura 13 hi ha els DP obtinguts utilitzant les mateixes dades però fent la representació amb base al període de llum al qual estan sotmesos els animals, és a dir, en base al TC. S'ha exclòs en aquesta representació les gràfiques dels animals del grup T24, ja que coincideixen amb la representació anterior.

En les gràfiques dels grups T22 i T23 s'observa, a l'igual que en les gràfiques anteriors, la presència d'un component circadiari que segueix el cicle de llum foscó i a més la presència del component endogen no sincronitzat amb el cicle extern. Es pot observar, a més a més, que en el moment de ser deixats en curs lliure els animals del grup T23 aparentment surten tots en la mateixa fase, mentres que en els animals del grup T22 sembla que la fase de sortida no depèn del cicle de llum foscó, sinó que en tot cas depèn de la fase del component no encarrilable per la llum.

En les gràfiques del grup T25 s'observa durant els cicles de llum/foscor un patró trimodal ben definit, i s'observa en totes elles que el primer component de la fase d'activitat apareix amb certa anterioritat a l'inici de la fase de foscor. El patró trimodal es manté quan els animals són deixats en curs lliure.

En les gràfiques dels animals del grup T26 el patró trimodal és poc definit, i més aviat es pot parlar de components circadiaris que no mantenen entre ells relacions de fases estables.

Aquesta tendència és encara més manifesta en els grups T27 i T28, en els quals ja no es pot parlar de trimodalitat. En aquests dos grups s'observa, a més a més, que la fase d'activitat dels animals comença amb molta anterioritat a l'inici de la fase de foscor i acaba també amb anterioritat a la fase de llum. En les gràfiques dels animals #1 i #2 del grup T27 s'hi observa també la presència del segon component circadiari de període inferior al del cicle de llum/foscor.

Es pot observar mitjançant aquesta representació gràfica que els components de freqüència ultradiària que semblaven haver-hi en els grups T26 a T28 en la representació en base a 24 hores no existeixen com a tals, sinó que eren un efecte visual degut a la falta de coincidència entre el període dels animals i el període utilitzat pel DP.

3.3.3.- PERÍODES EN LA FASE DE LLUM/FOSCOR

En la Figura 14 es poden observar les gràfiques del PSB obtingudes analitzant les dades pertanyents als primers 61 dies de registre de cada animal (temps en el qual els animals estaven en cicles de llum/foscor). En tots els animals s'observa un pic significatiu corresponent al període del cicle de llum/foscor al qual està sotmès l'animal. En les gràfiques dels animals situats en T22 s'observen a més períodes significatius superiors al de les 22 hores, amb mitjana de $1510(\pm 6.96)$ minuts, i que corresponen al component circadiari no encarrilable per la llum d'activitat motora. Igualment, en les gràfiques dels animals situats en T23 es pot observar que en 5 dels 6 animals hi ha un segon pic significatiu superior a les 23 hores, amb una mitjana de $1509(\pm 6.44)$ minuts, que correspon al component endògen d'activitat motora.

També en el PSB de l'animal #2 del grup T27 s'hi pot observar un segon pic significatiu, de 1431 minuts, mentres que en l'animal #1 no s'hi

observa cap període significatiu al voltant de 1440 minuts, malgrat el que es visualitzava en els DP.

3.3.4.- MATRIUS GRÀFIQUES

En la Figura 15 es pot observar la matriu gràfica mitjana de cada grup d'animals. Els períodes utilitzats per a calcular les matrius gràfiques individuals van ser en tots els cassos el període del cicle de llum fosc al qual estaven sotmesos els diferents animals.

En tots els grups es pot observar una primera fase o seqüència de cicles en la qual es passa d'un patró relativament ultradiari a un patró circadiari. Aquest fenomen és més visible en les matrius gràfiques corresponents als animals situats en cicles de llum/fosc de períodes extrems.

Passada aquesta primera fase s'observa que en els succesius cicles hi ha una certa estabilitat en la potència dels diferents harmònics, si bé es pot observar que els diferents grups presenten una diferent distribució de potències en el cicle.

Aquesta diferent distribució de potències fa pensar que els animals dels diferents grups presenten un patró cíclic d'activitat motora diferent.

3.3.5.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA

En la Figura 16 es poden observar les gràfiques del patró cíclic mitjà d'activitat motora dels diferents grups d'animals, obtingut a partir del patró cíclic mitjà d'activitat motora dels diferents animals de cada grup. Aquestes gràfiques, en les quals s'hi ha marcat per cada valor els seus límits fiducials, evidencien que els patrons cíclics d'activitat motora dins de cada grup són relativament constants o estables, ja que els límits que s'obtenen pels diferents valors són relativament estrets. Al mateix temps, indiquen que hi ha diferències entre els patrons en funció del cicle de llum al qual estan exposats els animals, ja que les gràfiques dels diferents grups presenten diferències clares entre elles. El patró cíclic d'activitat motora, doncs, depèn en gran part del cicle de llum fosc en el qual estan exposats els animals.

A la part superior de la Figura 17 es pot observar en una sola gràfica el patró cíclic mitjà d'activitat motora de cada grup d'animals.

Per facilitar la seva visualització i interpretació s'han representat de cada grup el que serien dos cicles d'activitat motora, i s'han representat a escala de temps circadiari enlloc d'escala horària. Aquesta gràfica facilita la comparació visual dels patrons mitjans d'activitat motora de cada grup. Es pot observar que des del grup T22 al grup T28 el patró passa gradualment de unimodal a trimodal, si bé en els dos últims grups el primer pic d'activitat presenta una amplitud menor i una major durada.

Es pot observar també que es produeix un pic d'hiperactivitat en l'inici del període de foscor i, encara que no tan elevat, un pic d'hiperactivitat en l'inici del període de llum. Aquests pics es poden interpretar com a una resposta passiva al canvi de condicions de llum, ja que, tal i com s'ha comentat anteriorment pel cas dels animals del grup T24, quan els animals es deixaven en foscor constant no tenia continuïtat.

En tots els cassos, i especialment marcat en els grups T22, T23 i T24, s'observa que just després de l'inici de la fase de llum es produeix una caiguda dels nivells d'activitat motora que dura al voltant de dues hores. Aquesta caiguda d'activitat es pot interpretar també com a resposta passiva al canvi de llum, i el motiu pel qual és més marcada en els grups de períodes inferiors és que en aquests coincideix el final de la fase d'activitat amb l'inici de la fase de llum, mentre que en els altres la fase d'activitat s'acaba abans d'acabar-se la fase de foscor i per tant els nivells d'activitat ja es troben baixos.

En els animals dels Lots T22, T23 i T24 s'observa també que després d'aquesta caiguda d'activitat es produeix temporalment un lleuger augment d'activitat, però la seva falta de continuïtat en el moment en el qual els animals són deixats en foscor constant (veure les gràfiques DP) fan que tampoc es puguin considerar components endògens d'activitat.

3.3.6.- FASE ALFA I FASE RHO

A partir de la gràfica anterior s'ha deduit per cada grup d'animals quina seria la fase alfa i la fase rho, i s'ha representat en la mateixa Figura 17. Es pot observar que a mida que augmenta el període del cicle de llum es produeix un augment de la fase alfa en detriment del de la fase rho, i un avanç gradual de la fase alfa respecte la fase de foscor. En els animals del grup T27 i T28 s'observa a més a més que els valors d'activitat motora pertanyents a la fase alfa són majors quan hi ha foscor que quan hi ha llum.

En la Figura 18 es pot observar la gràfica que mostra la relació entre la durada de la fase alfa i la durada de la fase rho en funció del període de llum. S'observa que des del període 22 al període 25 hi ha un clar augment de la proporció alfa/rho, mentre que en la resta de períodes la relació es manté aproximadament constant o amb un lleuger augment a mida que es va fent gran el període.

Al costat d'aquesta gràfica es pot observar la gràfica que mostra en funció del període del cicle de llum la proporció d'activitat motora present en la fase alfa i en la fase rho. S'observa que des del període 22 al període 25 cada vegada hi ha més proporció d'activitat motora en la fase alfa, mentre que a partir del període 25 i fins al període 28 la proporció d'activitat motora en la fase alfa es manté constant o lleugerament descendent.

3.3.7.- FASES DE SORTIDA EN EL CURS LLIURE

Per cada animal s'ha calculat la fase en la qual apareix el seu ritme quan s'inicia la fase de fosc constant. En la Figura 19 es poden observar els resultats obtinguts en forma gràfica: per cada grup d'animals s'ha representat una esfera horària, en la qual una volta equival a un cicle de llum/fosc, i s'ha representat la fase obtinguda per cada animal a sobre de la respectiva esfera. A cada esfera horària hi ha marcada la fase de fosc i la fase de llum.

S'observa que els animals dels grups T23 al t26 tenen la fase en el centre de la zona de fosc, i per tant la fase ve determinada clarament per la fase de fosc del cicle de llum fosc.

Són importants per a interpretacions posteriors els resultats del grup T23. Ja s'ha comentat anteriorment que els animals del grup T23 presentaven dos components circadianis d'activitat motora, un dels quals no sincronitzava al cicle de llum/fosc. El fet que la fase vingui determinada pel cicle de llum/fosc indica que el component circadiari d'activitat motora que segueix el cicle de llum/fosc no és un component passiu, sinó que es tracta d'un component actiu regulat de manera endògena pel propi organisme. L'altre component circadiari, el que no sincronitza al cicle de llum/fosc, ha de ser forçosament endogen ja que no és reflex de cap periodicitat ambiental. Ens trobem, doncs, que els animals presenten simultaniament dos components circadianis endogens d'activitat motora amb períodes diferents.

Els animals pertanyents al grup T22 tenen la fase distribuïda d'una manera aleatòria en tota l'esfera. Aquesta aleatorietat aparent és en realitat motivada per l'existència del component endògen d'activitat motora no encarrilable per la llum, ja que, a diferència del què passa pel grup T23, la fase la determina aquest component.

Els animals del grup T27 presenten fases situades a l'inici del període de foscor, i els animals del grup T28 presenten les fases distribuïdes al final del període de llum i inici del de foscor. Els resultats d'aquests dos últims grups confirmen que la seva fase alfa comença amb anterioritat a la fase de foscor, i que aquesta anterioritat és més important en el grup T28 que en el grup T27.

3.3.8.- PERÍODE EN CURS LLIURE

A continuació s'ha calculat mitjançant el PSB el període que presenta cada animal quan és deixat en foscor constant (és a dir, des del dia 61 d'experiment fins al dia 90). En la Taula 1 es presenta per cada grup d'animals la mitjana d'aquests períodes amb els seus límits fiducials. Es pot observar que els animals situats en cicles de llum/foscor amb períodes baixos tendeixen a tenir el període en curs lliure més baix que els situats en cicles de llum/foscor de períodes alts.

En la Figura 20 es mostren els diferents períodes obtinguts en cada grup, juntament amb el millor ajust que s'ha pogut obtenir amb aquestes dades respecte el període del cicle de llum foscor al qual els animals estaven sotmesos (ajust a un polinomi d'ordre 3, amb un coeficient de correlació del 0.812 i una $p < 0.001$ per tots els paràmetres estimats). El punt d'inflexió del polinomi obtingut al fer l'ajust correspon a un període de 24.82 hores, hi ha un màxim local en el període 26.7 hores i un mínim en el període 22.95 hores. Aquests resultats posen de manifest la relació entre el període del cicle de llum i el període que presenten els animals quan són deixats en curs lliure, i mostren que la relació és aproximadament linial pels grups situats en períodes intermitjos (T23 a T26), però que aquesta linialitat es perd en els grups extrems (T22, T27 i T28).

3.3.9.- ANÀLISIS DELS COMPONENTS NO ENCARRILABLES PER LA LLUM DELS GRUPS T22 I T23

En els grups T22 i T23 s'han realitzat també una sèrie d'anàlisis per tal de poder fer una més bona interpretació dels dos components circadiaris d'activitat motora que apareixen durant els dies en que es trobaven en cicle de llum/foscor.

No s'han realitzat aquests tipus d'anàlisi pel grup T27 perquè el segon component només era present en dos animals (només un si considerem els resultats del PSB), i no es disposava de suficient casuística de cara a possibles contrastos d'hipòtesis.

3.3.9.1.- Interacció entre el component no encarrilable per la llum i l'encarrilable

Per determinar el grau d'interacció s'ha calculat per cada animal l'amplitud de la oscil·lació que produeix el component no encarrilable per la llum a la fase de foscor i l'amplitud de la oscil·lació que produeix el component endògen en la fase de llum.

Els resultats de la comparació d'amplituds, realitzats per separat per cada grup mitjançant el test de la t de Student per dades aparellades, es poden observar a la Figura 21. En els dos grups estudiats (T22 i T23), s'observa que l'amplitud en la fase de foscor és superior a l'amplitud en la fase de llum ($p < 0.05$). Es dedueix, doncs, que quan hi ha coincidència en les fases d'activitat dels dos components l'activitat que es manifesta és superior a la que presenta cada component per separat.

3.3.9.2.- Comparació dels períodes del component no encarrilable per la llum

En l'anàlisi dels períodes del component no encarrilable per la llum obtinguts amb el PSB no s'obtenen diferències significatives entre un i altre grup ($p > 0.30$), tot i que el valor mig dels períodes del grup T23 és inferior al del grup T22. (Figura 22A).

3.3.9.3.- Relació entre el període del component no encarrilable per la llum i el període en curs lliure

En quan a la correlació entre el període del component no encarrilable per la llum i el tau que presenten els animals un cop deixats en fosc constant, s'observa que en els animals del grup T22 hi ha tendència a una correlació positiva ($p < 0.16$) mentre que en els animals del grup T23 no s'observa correlació ($p > 0.47$). Ajustant el període en curs lliure dels animals del grup T22 respecte al període del seu component no encarrilable per la llum mitjançant una funció polinòmica d'ordre 2 s'obté un coeficient de regressió de 0.65 amb tots els paràmetres d'ajust significatius, que confirma la tendència que s'havia observat en la correlació linial. En els animals del grup T23, en canvi, tampoc s'obté per la funció polinòmica d'ordre 2 un ajust significatiu (Figura 22B).

Aquests resultats indiquen que en els animals del grup T22 el component no encarrilable per la llum influeix en el període que presenten un cop situats en curs lliure, mentre que no passa el mateix amb els animals del grup T23. Aquests resultats són comparables amb els obtinguts en l'anàlisi de la fase de sortida del component circadiari d'activitat motora: en ser deixats en curs lliure, els animals del grup T22 presentaven una fase determinada pel component no encarrilable per la llum, mentre que els animals del grup T23 presentaven fases determinades per la fase de fosc del cicle llum/fosc.

Sembla, d'alguna manera, que el component endogen no encarrilable per llum és més important en els animals del grup T22 que en els del grup T23.

3.3.9.4.- ICP del component encarrilable per la llum i del component no encarrilable

Per cada animal del grup T22 i T23 s'ha calculat l'ICP dels dos components circadiaris. En la comparació dels índex obtinguts (Figura 23) s'observa que en els dos grups d'animals l'ICP del component encarrilable a la llum és superior al del component no encarrilable. En la comparació dels ICP d'un grup amb els de l'altre, s'observa que els ICP dels components no encarrilables són majors en el grup T22, mentre que els ICP dels components encarrilable són menors en el grup T22, encara que en aquest últim cas és només una tendència ($p < 0.135$).

Amb aquests resultats sembla, també, que el component no encarrilable és més important en els animals del grup T22. A més, hi ha

indicis de que el component encarrilable és, en els animals del grup T22, menys important que en els del grup T23.

3.4.- DISCUSSIÓ

Tal com ha estat comentat anteriorment, un dels nostres objectius en aquest treball ha estat l'estud de la sincronització de les rates a cicles diferents de 24 hores. Hem trobat que els animals han pogut sincronitzar a tots els cicles de llum fosc assaigats, que corresponien a períodes compresos entre 22 i 28 hores. Cal constatar que aquests marge d'encarrilament és més ampli al que es troba descrits a la bibliografia en rates albines adultes, que es trobaria comprès en un rang menor. Honma i col. (1985 Pura), per una banda, estableixen a partir de la Corva de Fases de Resposta obtinguda amb rates albines amb polsos de llum de 30 minuts de durada que el màxim avanç de fase que es pot produir és de 1'5 hores, i el màxim retard és de 3 hores. Summer i col. (1985), per la seva banda, descriuen un retard màxim de 4 hores i un avanç màxim de 1.5 hores. Segons aquests resultats, i tenint en compte que teòricament el rang de sincronització estaria limitat pel període obtingut al sumar i restar al tau de l'animal el màxim retard de fase i el màxim avanç de fase, els animals dels lots T23 i T28 podria ser que no sincronitzessin al cicle de llum/fosc, i els animals del lot T22 en cap cas podrien sincronitzar. Podria ser, doncs, que els animals que hem utilitzat presentessin uns marges de sincronització casualment diferents als dels altres dos estudis, però és una explicació que no sembla correcte donada la relativa coincidència que s'observa en les CFR, i que indica que no hi ha gaire variació en els marges d'encarrilament. Una altre explicació podria trobar-se en el fet que les CFR només indiquen el canvi de fase que produeixen pulsos de llum de curta durada, mentres que en els nostres animals els 'pulsos' de llum són molt més llargs.

Cal tenir en compte, a més a més, que independentment als canvis de fase que produeix la llum aquesta podria tenir per si mateix un efecte sobre la pròpia velocitat dels oscil.ladors. Segons el model proposat per Diez-Noguera (1993) el sistema circadiari estaria format per múltiples oscil.ladors i el grau d'acoblament d'aquests oscil.ladors determinaria el tau del sistema. La llum, segons aquest model, tindria un efecte inhibitor de l'acoblament dels oscil.ladors i com a conseqüència es produiria un augment de període del sistema. Des d'aquest punt de vista, en animals situats en cicles de llum fosc amb fases llargues de llum la CFR no

seria suficient per la determinació dels marges d'encarrilament. De tota manera, tot i que no podem negar l'efecte de la llum sobre el sistema circadiari dels animals, cal tenir present que, degut a que els ritmes de llum-foscó són simètrics, tots els animals al final de l'experiment havien rebut la mateixa quantitat de llum.

Potser la diferència en quan als marges d'encarrilament cal trobar-la en el fet que els animals utilitzats en aquest experiment eren tot just destetats de la mare. Es a dir, els animals van ser sotmesos a cicles llargs o curts quan el seu sistema nerviós encara es troba en fase de maduració.

No hem trobat referències que puguin indicar que els marges d'encarrilament d'animals joves hagin de ser similars als dels animals adults, i no semblaria estrany que els animals joves fossin més adaptables que els animals adults, els quals ja tenen un sistema circadiari ben establert. Això no ens sorprendria tenint en compte que el sistema circadiari dels animals joves és més plàstic que el dels animals adults (****)

Un dels resultats més rellevants d'aquest experiment, ha estat la presència de dos components en el ritme d'activitat motora de molts dels animals. Aquests dos components són molt evidents en els el cas dels animals sotmesos a cicles curts com els T22 i T23, força visibles en el cas dels animals a T24 i lleugerament identificables en algun dels animals sotmesos a T27. Aquests dos components fan pensar en la presència d'un sistema circadiari format per al menys dos oscil·ladors o grups d'oscil·ladors. Un d'ells seria un oscil·lador encarrilable pels cicles de llum-foscó, ja que es presenta el component d'activitat amb un període igual al T extern. L'altre oscil·lador és independent dels cicles llum-foscó, però manifesta igualment un període circadiari. En tots els casos aquest component és superior a les 24 hores, apropant-se al tau de l'animal. Cada un d'aquests dos oscil·ladors genera un patró circadiari d'activitat motora, i l'animal és mou segons la superposició d'aquests dos patrons. És important destacar que quan hi ha interacció entre els dos components es produeix un increment en l'activitat motora, molt superior a la suma de l'activitat dels dos components per separat. Això juntament amb el fet que no hi ha modificació de la fase ni del període de cap dels dos components, ens fa pensar que es tracta de dos oscil·ladors que són independents, no hi ha interacció en cap relació de fases, però que el sistema de sortida ha de ser el mateix, produint-se un increment de l'activitat quan en la sortida actuen els dos sistemes.

Molts altres autors proposen el sistema circadiari com a sistema multioscil.lador (Rosenwasser i Adler, 1986, Díez-Noguera, 1993). Alguns d'ells proposen que aquests oscil.ladors poden estar agrupats formant al menys dos oscil.ladors diferents. Així Pittendrigh i Daan (1976) proposen l'existència de dos oscil.ladors, tots dos sensibles a la llum, un que regularia l'inici de l'activitat respecte al apareixer la llum i l'altre al apareixer la foscor. Stephan (1983) proposa que a la rata existeixen dos grans oscil.ladors, un d'ells sincronitzable a la llum i l'altre sincronitzable a cicles de menjar restringit.

En el nostre cas, i observant els resultats obtinguts a T22 i T23 no podem pensar que es tracti de dos oscil.ladors concrets, més aviat pensem en una diferent distribució de múltiples oscil.ladors que forment el sistema circadiari. Pensem en un sistema circadiari de la rata format per múltiples oscil.ladors cadascun amb una freqüència determinada, però d'ordre circadiari (Díez-Noguera 1993). Els oscil.ladors es poden acoblar entre ells generant el ritme manifest. De la mateixa manera es poden acoblar a un T extern. En el cas de cicles T25 o T26, el T extern es proper a la freqüència de la major part dels oscil.ladors i tots ells poden sincronitzar. Quan el T disminueix, al passar de T25 a T22, hi ha oscil.ladors que la seva freqüència queda allunyada del cicle extern i no poden sincronitzar, manifestant-se llavors la seva activitat segons el període propi de cada oscil.lador. Mentre més ens allunyem de T25 més oscil.ladors "escapen" del cicle extern. Això ho podem deduir al observar com el component no encarrilable per la llum és més important a T22 que a T23 (ICP). Segons el nostre raonament la gran majoria dels oscil.ladors del sistema circadiari de la rata tindrien freqüències superiors a 25-26 hores. Per aquest motiu els animals sincronitzarien millor a cicles llargs, que no pas a cicles curts. Podriem especular que potser altres espècies que presenten un període endògen més curt, poguessin manifestar els dos components quan estàn sotmesos a cicles llargs i no pas a cicles curts com la rata.

Podem concloure també dels nostres resultats que el tau en curs lliure depen de les condicions externes a les que l'animal ha esta sotmés. Estudiant la relació entre el T extern i el τ en DD s'observa que mentre més llarg és el T, més llarg és τ excepte en els valors extrems, en els que els valors de τ s'aproximen. Això ens permet pensar que en els T extrems, que l'importància del cicle de llum no és tant gran, es a dir que la sincronització no ha estat completa.

Els resultats que s'observen en els animals mantinguts a T24 fan questionar la diferència entre "masking" i "entrainment". Sembla un fet inquestionable que els animals sincronitzin a 24 hores, presentant-se un component d'activitat a l'inici de la fase de foscors que reflexa l'anticipació a la foscors. En el nostre cas, no creiem que el component d'activitat que s'observa a l'inici de foscors sigui realment degut a una sincronització amb el T extern. Sinó que creiem que pot ser l'efecte d'un enmascarament sobre el ritme d'activitat de l'animal. Cal tenir present que aquest component d'inici de foscors desapareix gairebé de forma immediata quan l'animal es deixa en curs lliure. Si fos sincronització ens caldria esperar que es manifestés al menys durant alguns dies. El "masking" pot modificar o suprimir l'expressió d'oscil·ladors interns en moltes situacions i aquests factors d'enmascarament poden derivar directament de l'entorn, indirectament per canvis conductuals o per canvis en la fisiologia o bioquímica interna de l'animal que s'està considerant (Minors i Waterhouse, 1989). En el cas dels T24 el masking pot modificar l'expressió dels oscil·ladors i es presenta anticipació a la foscors, però no deixa de ser un enmascarament que desapareix un cop desapareix el factor llum. Cal observar també que en aquest cas la presència del segon component té lloc únicament durant la fase d'activitat de l'animal, mentre que no es manifesta en fase de repòs. Això ens fa pensar que un cop alguns oscil·ladors estan encarrilats, els altres poden manifestar-se només en unes fases, "finestres", determinades (Davis i Menaker, 19***). Dins d'aquestes finestres podem observar que els dos oscil·ladors presenten relacions que normalment s'havien descrit entre el zeitgeber i l'oscil·lador, com per exemple sincronitzacions relatives (Pittendrigh i Daan 1976). Així observem que el component no encarrilat presenta canvis de fase segons la relació de fases amb el component encarrilable.

Pel que fa a l'estudi del patró d'activitat motora, és destacable la diferència que existeix en la forma del ritme de cada grup d'animals. D'entrada observem que tots els animals un cop en curs lliure presenten un patró trimodal força semblant entre ells. En canvi mentre estan encarrilats presenten una forma d'ona diferent, observant-se una graduació en el canvi al passar progressivament de T22 a T28.

Pels animals situats en cicles de llum/foscors de períodes inferiors al seu període endogen s'observa com hi ha una fase d'activitat pràcticament restringida a la fase de foscors. A mesura que es va allargant el període del cicle de llum-foscors sembla com si s'estirés la fase d'activitat, presentant-se dos períodes d'activitat molt marcats amb una

devallada d'activitat entremig (T24). A partir de T25, apareixen 3 components d'activitat, molt marcats en T25 i T26 que tenen tendència a aplanar-se i a durar més temps en els lots T27 i T28. En estudiar la forma d'ona va surgir el problema de la dificultat en mesurar les fases alfa, activitat, i rho, repòs, del ritme d'activitat motora dels animals, ja que quan els animals presenten patrons ultradiaris ben definits és difícil de determinar l'inici i final de cada fase. En el nostre cas, la determinació de l'inici de les fases alfa i rho s'ha fet tenint en compte no cada grup individualment sino atenent al canvi de forma gradual que s'observa en els diferents grups. D'aquesta manera podem concloure com la fase alfa incrementa al passar de T22 a T28, essent aquesta tendència pronunciada fins a T25 i més asimptòtica de T25 a T28. Aquesta conclusió resultats difereix de la proposada per Daan i Pittendrigh (1976), segons la qual la fase alfa es fa més estreta a mida que ens allunyem del període endògen, sent molt més curta quan l'encarrilament té lloc sota períodes llargs.

Així doncs acceptant que la fase alfa s'allarga sota cicles llargs, podem tornar a questionar-nos si el pic d'activitat corresponent a l'inici de la llum és un fenomen de masking o de sincronització, ja que no seria res més que un increment d'activitat ja dins de la fase alfa.

Segons les diferents formes d'ona, hem de pensar que els components ultradiaris no depenen directament de la longitud del ritme circadiari, ja que sino observariem la mateixa forma d'ona però més o menys allargada, sinó que són conseqüència de la diferent relació entre els oscil·ladors que dirigeixen el ritme, i que aquesta relació varia segons la longitud del cicle extern.

4.- EXPERIMENT 2
ESTUDI DE L'ACTIVITAT MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A
DIFERENTS INTENSITATS DE LLUM

4.1.- OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest experiment consisteix en estudiar el desenvolupament del ritme circadiari d'activitat motora en rates joves situades totes en condicions de llum constants però en diferents intensitats. Així mateix, estudiar com varia en funció de la intensitat de llum el patró d'activitat motora dels animals un cop adults.

4.2.- DISSENY

Amb data 12 d'abril de 1993 van arribar al laboratori 8 rates femella Wistar, totes elles en procés de gestació. Des de la seva arribada es van formar quatre grups de dos animals cada un i es va situar cada grup en una cabina insonoritzada diferent, a una temperatura de $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. Els animals es van mantenir amb dieta A03 Panlab i se'ls hi subministrà aigua de la xarxa ad libitum. En totes les cabines es van mantenir condicions constants de llum, però cada cabina tenia una intensitat de llum diferent seguint una escala logarítmica: una cabina estava a 0.25 Lux de llum vermella (L0.25), una altre a 4 Lux (L4), una altre a 37 lux (L37) i la darrera a 497 Lux (L497).

Després del part i del procés de lactància de les cries, i concretament en el moment que les cries tenien 23 dies d'edat, es seleccionaven de cada rata progenitora dues cries femella i dues mascle, les quals se situaven en gàbies individuals i s'iniciava el registre de la seva activitat motora. La resta d'animals eren sacrificats. L'activitat motora dels diferents animals es registrà durant aproximadament 50 dies, utilitzant sensors d'infraroig i amb un interval de mostreig regular de 15 minuts. Durant tot aquest procés es mantenien sempre les condicions d'il·luminació de la rata progenitora. Al finalitzar aquesta fase els animals eren sacrificats.

Una de les rates progenitores del grup L0.25 va tenir cries amb deformacions i no es van poder utilitzar pel registre, i degut a que la selecció de les cries de l'altre progenitora es va fer a 0.25 Lux el grup va quedar mal balancejat, amb tres femelles i un sol mascle. En la resta de grups no hi va haver problemes i el nombre de cries va ser el desitjat,

meitat mascles i meitat femelles, i meitat d'una progenitora i meitat de l'altre.

4.3.- RESULTATS

4.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES

Des de la Figura 24 fins la Figura 27 es poden observar les gràfiques DP individuals dels diferents animals en base a 24 hores, agrupades en funció de la intensitat de llum.

En les gràfiques dels animals del grup L0.25 s'observa un patró circadiari des del primer a l'últim cicle de registre. En els primers cicles, però, s'observa que el component circadiari és menys definit que en els posteriors, i s'hi observen a més a més components de freqüència ultradiària. El període del ritme circadiari d'activitat motora és en tots els cassos superior a les 24 hores. S'observa també en totes les gràfiques un pic d'elevada activitat tan a l'inici com al final de la fase d'activitat (i especialment important aquest últim), i entre aquests dos pics apareix en alguns animals un tercer pic no tan marcat com els primers; es poden considerar, doncs, patrons bi o tri-modals. De l'observació d'aquestes gràfiques no se'n desprenen diferències de patró degudes al sexe.

En les gràfiques dels animals pertanyents al grup L4 s'observa que inicialment el patró d'activitat motora que presenten és altament ultradiari, i que tarden al voltant de 10 dies en adquirir un patró circadiari. En tots els cassos el període del ritme circadiari és superior a les 24 hores. Un cop presenten un ritme circadiari clar aquest no és tan estable com el que presentaven els animals del grup L0.25, i és de tipus bimodal. En aquest cas, i a diferència de l'anterior, la tendència és tenir el primer component més marcat que el segon. Tampoc s'observen diferències entre el patró de les rates mascles i el de les rates femelles.

Les gràfiques dels animals del grup L37 són similars a les del grup anterior. Els animals tarden al voltant de 10 dies a passar d'un patró inicialment ultradiari a un patró circadiari. El període del ritme circadiari és superior a les 24 hores. El patró que presenten la majoria d'animals és bimodal, també amb el primer component més marcat que el segon, però

Experiment 2

en alguns animals és unimodal. Tampoc s'observen amb aquestes gràfiques diferències entre mascles i femelles.

Les gràfiques dels animals pertanyents al grup L497 també presenten inicialment un patró ultradiari que passa a ser circadiari al cap d'aproximadament 10 dies. El ritme circadiari, relativament inestable, té un període superior a les 24 hores en tots els animals. El patró sembla ser en la majoria d'animals unimodal, i en algun animal bimodal amb un primer component d'activitat més marcat que el segon. Tampoc sembla que hi hagi deferències en funció del sexe.

En alguns animals dels grups L4, L37 i L497 sembla haver-hi una sèrie de components circadianis puntuals d'activitat motora amb períodes lluegerament inferiors a les 24 hores sobreposats al component circadiari principal.

4.3.2.- PERÍODES DEL COMPONENT CIRCADIARI

En la Taula 2 es poden observar les mitjanes i els seus límits fiducials dels períodes obtinguts mitjançant el PSB, agrupats en funció de la intensitat de la llum i del sexe.

En la comparació dels períodes en funció de la intensitat de llum i del sexe, realitzats per ANOVA (Taula 3), s'observa que l'únic factor que influeix significativament sobre els períodes és la intensitat de llum. En les posteriors comparacions en funció de la intensitat de llum s'obtenen diferències entre els períodes del grup L0.25 i els altres tres grups (els del grup L0.25 són inferiors), però no hi ha diferències significatives entre aquests tres grups. En resum, doncs, es pot dir que els animals del grup L0.25, indistintament mascles i femelles, presenten períodes inferiors als dels grups L4, L37 i L497, i que entre aquests tres grups no hi ha diferències significatives en quan al període.

El millor ajust que s'ha pogut realitzar pels valors dels períodes en funció del logaritme de la intensitat de llum correspon a una funció exponencial negativa, amb la qual s'obté un coeficient de regressió de 0.807 i una $p < 0.0001$ pels dos paràmetres estimats (veure gràfica inferior de la Figura 30). Segons aquesta gràfica a intensitats altes de llum petites diferències d'intensitat provocarien canvis inapreciables de tau, mentres que a intensitats baixes petits canvis d'intensitat provocarien grans canvis de tau.

Per acabar de confirmar aquest fet, però, faltaria conèixer els taus d'algun grup d'animals situat a una intensitat de llum inferior als 4 lux i superior als 0.25 lux.

4.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES

A la Figura 28 es poden observar les matrius gràfiques mitjanes dels diferents grups d'animals, agrupades en funció de la intensitat de la llum i del sexe. Per al càlcul de les matrius gràfiques individuals es van utilitzar de períodes els taus dels animals.

En la matriu gràfica mitjana del grup L0.25 s'observa que passats tres o quatre cicles en els quals els harmònics 7, 9 i 10 són relativament importants, l'espectre de potències es manté relativament constant, amb valors elevats pels harmònics 1,2,3 i 5, i relativament baixos per la resta d'harmònics.

Observant les matrius gràfiques mitjanes dels mascles i femelles d'aquest grup, s'observa que són similars si bé en les femelles el tercer harmònic sembla ser més potent que en els mascles.

En la matriu gràfica mitjana del grup L4 s'observa que inicialment els harmònics d'elevada freqüència (del 6 al 10) tenen potències elevades, i que al voltant del vuitè cicle passen a dominar els quatre primers harmònics, especialment l'harmònic 1 i l'harmònic 3. Passats uns 20 cicles el segon harmònic perd el seu contingut de potència i el tercer harmònic també el perd però de forma parcial, i s'afegeixen com a harmònics importants de l'espectre els harmònics 5 i 6. Aquesta distribució de potències es manté ja fins al final de l'experiment.

Comparant visualment la matriu gràfica mitjana de mascles i femelles d'aquest grup s'observa inicialment un patró similar, si bé als últims cicles els mascles sembla que tenen components de freqüència més elevada que les femelles.

En la matriu gràfica mitjana del grup L37 s'observa inicialment elevada potència en els harmònics 6 al 12. Passats al voltant de 8 cicles passen a dominar els tres primers harmònics, i al voltant del cicle 17 disminueix la potència del segon i tercer harmònic i augmenta la potència dels harmònics 5 i 6, mantenint-se ja el repartiment de potències fins als últims cicles.

Experiment 2

No s'observen en aquest cas grans diferències en entre mascles i femelles, si bé sembla que el primer harmònic en la matriu gràfica mitjana de les femelles sembla tenir més potència.

En la matriu gràfica mitjana del grup L497 s'observa inicialment elevada potència des de l'harmònic 6 a l'harmònic 11. Passats al voltant de 7 cicles hi ha una transferència relativament brusca de potències cap a harmònics de més baixa freqüència, i queda establert un espectre de potències amb els harmònics 1, 5 i 6 com a dominants.

A l'igual que el grup anterior, la diferència que sembla present entre la matriu gràfica mitjana dels mascles i de les femelles es troba en la potència del primer harmònic, que sembla ser superior en les femelles.

4.3.4.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA

En la Figura 29 es poden observar els patrons mitjans d'activitat motora dels diferents animals agrupats per grups i segons els sexe.

Els animals del grup L0.25 presenten un patró mitjà bimodal, en el qual el segon component sembla tenir major amplitud que el primer. Entre els dos pics d'activitat s'observa una fase en la qual els nivells d'activitat són inferiors als dels pics però superiors als nivells presents en la fase de repòs. També s'observa, en aquesta gràfica, un transició relativament ràpida entre la fase d'activitat i la de repòs. En la comparació visual de les gràfiques pertanyents a un i altre sexe s'observa que la gràfica de les femelles sembla presentar un component bimodal més marcat.

En la gràfica dels animals del grup L4 s'observa també un patró relativament bimodal, en el qual el primer component és més marcat que el segon, i es pot observar que la transició entre activitat i repòs no és tan brusca com en el cas anterior. A l'igual que en el cas anterior, la gràfica corresponent a les femelles presenta un component més marcadament bimodal que la dels mascles.

En la gràfica del grup L37 s'observa que el primer component del patró bimodal no és tan marcat com en el cas anterior, i que el segon component pràcticament ha desaparegut deixant lloc a una fase d'activitat amb valors d'activitat motora intermitjos. En aquest cas la gràfica corresponent als mascles i la corresponent a les femelles no

presenten grans diferències, si bé la transició cap a la fase d'activitat semba més pronunciada en les femelles que en els mascles.

En la gràfica del grup L497 s'observa que el patró és unimodal, amb una transició lenta des de nivells baixos d'activitat motora als nivells alts, i també lenta en el procés invers. Comparant visualment el patró de mascles i femelles s'observa que en les femelles l'amplitud de la oscil·lació és més pronunciada que en els mascles.

En conjunt, doncs, es pot dir que amb l'augment de la intensitat de llum el patró d'activitat motora passa gradualment de bimodal a unimodal, aparentment amb detriment del segon component del patró bimodal, i es pot dir també que aquesta transició és més marcada en les femelles que en els mascles.

4.3.5.- SOROLL PRESENT EN EL PATRÓ

Per tal de fer comparacions en quant al soroll present en els registres dels diferents grups d'animals, es va obtenir per cada animal el promig dels IS dels cicles 15 al 45.

A la Taula 4 es poden observar mitjanes i límits fiducials de les mitjanes pels diferents grups i sexes.

En l'anàlisi de la variança (Taula 5) en funció del sexe dels animals i de la intensitat de llum a la qual estaven situats només s'obtenen diferències significatives pel factor intensitat de llum, mentres que pel factor sexe, tot i que no són diferències significatives, es pot observar una tendència dels mascles a tenir més un IS més elevat que les famelles.

En la regressió dels IS mitjans de cada individu en funció del logaritme de la intensitat de llum a la qual està sotmès s'obté una R de 0.42 amb una $p < 0.03$ (Figura 31). Es pot dir, doncs, que el valor mitjà de l'IS és funció del logaritme de la intensitat de llum a la qual està sotmès l'animal, augmentant un quan augmenta l'altre. En resum, doncs, a mesura que augmenta la intensitat de llum augmenten els pics d'activitat motora no associats a les variacions d'activitat produïdes pel component circadiari principal.

4.3.6.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ/DESACTIVACIÓ

A partir del patró mitjà de cada animal s'ha determinat el seu IA/D. En la Taula 6 es poden observar els valors mitjans i els seus límits fiducials dels IA/D agrupats per grups i per sexe.

En l'anàlisi de la variança (Taula 7) utilitzant aquests factors s'obté que no hi ha diferències significatives degudes al sexe, i si que n'hi ha pel factor intensitat de llum.

En la regressió de l'IA/D en funció del logaritme de la intensitat de llum s'obté una R de -0.485 amb una $p < 0.01$ (gràfica inferior de la Figura 32).

Es pot dir, doncs, que a mesura que augmenta la intensitat de llum disminueixen els IA/D, o, dit d'altra manera, les transicions entre la fase d'activitat i la de repòs es tornen més lentes.

4.3.7.- ÍNDEX DE CONSTNCIA DE PATRÓ

Per cada animal per separat s'ha determinat l'ICP. En la Taula 8 es poden observar els valors mitjans de l'ICP i els seus límits en funció dels grups i del sexe.

En la comparació per ANOVA (Taula 9) dels ICP individuals enfront del factor intensitat de llum i sexe s'observa que hi ha diferències significatives pels dos factors. Comparacions posteriors indiquen que l'ICP és superior en les femelles, i per tant segons aquests resultats les famelles presentarien un patró més estable que els mascles.

En la correlació entre l'ICP i la intensitat de llum, s'obté una R de -0.6 amb una $p < 0.002$, que indica que a més intensitat de llum més variable és el patró de l'animal (Figura 33).

4.4.- DISCUSSIÓ

Aquest treball mostra la importància de la intensitat d'il·luminació en el desenvolupament del ritme circadiari de la rata i sobre tot en l'adquisició d'un patró de forma d'ona determinat. D'entrada cal comentar que tot i que molta part de la discussió es centra en la relació de

diferentes variables en funció de la intensitat de llum, aquesta comparació no és excessivament correcta. Els animals del grup L0.25, rebien il.luminació d'una font vermella, mentre que en els demès grups la font d'il.luminació era blanca. De fet el motiu, va ser perquè volíem un grup "control" que estigués a les fosques, però per tal de poder entrar a l'habitació per alimentar els animals, ens calia llum vermella. La llum vermella pràcticament no afecta el ritme dels animals (***) i per tant els seus efectes no serien comparables a una il.luminació de la mateixa intensitat però d'un altre longitud d'ona.

Tal com ha estat descrit (Davis 1981***) els animals joves presenten gran quantitat de components ultradiaris que evolucionen fins a adquirir un ritme circadiari estable. Aquesta evolució depèn de la intensitat de llum (Cambras i Díez-Noguera, 1991) i del fotoperíode (Siebert i Wollnik, 1993).

El sistema circadiari és sexualment difòrmic. Aquest dimorfisme es troba ja a nivell de la anatomia del nucli supraquiasmàtic (Güldner 1983, Swaab 198***) com a nivell del patró dels ritmes (Díez-Noguera et al, 1986; Wollnik 1985). Pel que fa a aquest segon aspecte cal destacar que hi ha diferència en el patró respecte als components ultradiaris (Büttner i Wollnik 1984). La major part d'aquestes diferències s'han associat al paper de les hormones sobre el sistema circadiari (Turek 1982). Tot i així en el nostre treball no hem pogut detectar diferències entre els sexes en cap de les variables que hem estudiat.

Si que ha resultat significatiu, també com esperavem, la intensitat de llum sota la que es mantienien els animals. El tau és significativament més curt en els animals mantinguts a 0.25 lux de llum vermella comparat amb els altres animals. De tota manera entre els altres grups no hi ha diferències significatives. Això ens fa pensar que tot i que els nivells de il.luminació són baixos i no arriben a la saturació de la descàrrega de les cèl.lules del NSQ (Meijer i Rietveld 1989), d'alguna manera en l'organisme sencer s'arriba abans a la saturació dels efectes de la llum. En futurs treballs seria convenient l'estudi dels ritmes a intensitats de llum inferiors a 4 lux.

L'observació dels espectres de potència ens mostra diferències pel que fa a la composició i a la evolució de la forma del ritme. La forma d'ona mitjana ens indica que a mida que augmenta la intensitat de llum la corba és torna més suau i menys bimodal que en el grup L0.25. Per tal

de poder quantificar la forma d'ona i comparar-la entre els diferents grups, és pel que es van idear els index IA/D, ICP i IS. No hem trobat descrita cap metodologia semblant aplicada a l'estudi de la forma del ritme circadiari dels animals, i cal comentar que han estat de gran utilitat per poder establir diferències en base a una anàlisi matemàtica i no únicament visual. Així doncs l'anàlisi dels ritmes ens ha permès concloure que a mida que incrementa la intensitat de llum el patró no és tant uniforme, es presenta més soroll, per tant podríem dir que es presenta més components d'activitat no lligats directament amb el component circadiari característic. Igualment per l'IA/D hem observat que l'ona és menys quadrada a mida que incrementa la intensitat, és a dir que els increments o descensos d'activitat de l'animal són molt més suaus. Per últim el ICP ens permet concloure que el patró és més variable mentre més il.luminació. Aquest index és l'únic que ha estat diferent per a mascles o femelles, essent les femelles els que tenen els valors més estables.

Aixó ho podem interpretar pensant en un sistema multioscillador. La llum actuaria sobre el sistema circadiari desacoblant els oscil·ladors que el formen (Aschoff 1981; Díez-Noguera 1993). D'aquesta manera mentre més intensitat de llum més desacoblats estaran els oscil·ladors, menys estable serà el ritme i més suau serà la transició entre les fases d'activitat i no activitat, ja que seràn degudes a l'acció gradual dels diferents oscil·ladors, ja força desincronitzats. Si el desacoblament fós molt més fort s'arribaria a presentar arritmicitat en el ritme manifest.

De tota manera cal destacar que la rata adulta sotmesa a condicions d'il.luminació constants, presenta arritmicitat i disminució del component circadiari ja a intensitats molt baixes (Boulos 1980, Eastman i Rechtstchaffen 1983***). Per tant degut a que els nostres animals presentaven un ritme circadiari en totes les il.luminacions ens fa pensar que la llum constant té un efecte diferent sobre els animals adults que sobre els petits. Per tant podem assumir que ja que en els animals joves les connexions entre els oscil·ladors que formen el sistema circadiari no estan encara formades, el sistema pot evolucionar sota qualsevol condició de llum per tal d'adquirir el sistema circadiari. La morfologia del sistema circadiari podria doncs ser diferent segons les condicions de llum sota les que han crescut els animals.

Tal com ha estat descrit a la bibliografia no tots els processos fisiològics presenten fluctuacions circadianes al moment del neixement.

Per exemple el ritme de la NAT pineal apareix sobre el dia 4 després del naixement però no està totalment desenvolupat fins al dia 30 (Ellison et al 1972). Paral·lelament el ritme de temperatura presenta un ritme estable sobre el dia 15-17 després del neixement però la forma característica de l'animal adult no es presenta fins al dia 50 després del neixement. En el nostre experiment observem que tot i que el ritme circadiari es manifesta gairebé al primer dia després del desalletament (22 dies d'edat), va evolucionant fins arribar a un ritme estable al cap de 10 dies aproximadament. En el cas dels animals nascuts sota condicions de llum blanca, la evolució es dona una mica més lentament, però dins dels límits descrits a la bibliografia.

5.- EXPERIMENT 3
ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT
MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A DIFERENTS INTENSITATS
DE LLUM

5.1.- OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest experiment consisteix en estudiar com efecte la pinealectomia en el desenvolupament del ritme circadiari d'activitat motora de rates joves situades totes en condicions de llum constants però en diferents intensitats. Així mateix, estudiar com varia en funció de la intensitat de llum i de la pinealectomia el patró d'activitat motora dels animals un cop adults.

5.2.- DISSENY

Amb data 1 de març de 1993 van arribar al laboratori 4 rates femella Wistar, totes elles en procés de gestació. Des de la seva arribada es van formar dos grups de dos animals cada un i es va situar cada grup en una cabina insonoritzada diferent, a una temperatura de $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. Els animals es van mantenir amb dieta A03 Panlab i se'ls hi subministrà aigua de la xarxa ad libitum. En les dues cabines es van mantenir condicions constants de llum, però en una cabina hi havia una intensitat de 0.25 Lux de llum vermella (LP0.25), i en l'altre 497 Lux (L497).

Quan les cries d'aquests animals tenien 3 dies d'edat es procedí a la pinealectomia: la meitat de les cries de cada animal van ser pinealectomitzades (Px), i l'altre meitat van ser operades però no se'ls hi extripà la pineal (*Sham*). Per tal de poder distingir unes cries de les altres, en el moment de l'operació s'escapçà el pabelló auricular dret de les cries Px i l'esquerra en les cries Sh.

Quan les cries tenien 23 dies d'edat, es van seleccionar de cada rata progenitora quatre cries femella i quatre mascle, la meitat Px i l'altre meitat *Sham*, i es van situar en gàbies individuals. En aquest moment es va iniciar el registre de la seva activitat motora, que durà al voltant dels 50 dies, utilitzant sensors d'infraroig i amb un interval de mostreig regular de 15 minuts. Durant tot l'experiment, exceptuant el moment de la pinealectomia per les rates LP0.25, les cries es van mantenir en les condicions d'il·luminació de la rata progenitora. Al finalitzar la fase de registre els animals eren sacrificats i es comprovava histològicament l'absència de la glàndula pineal en les rates Px i la seva presència en les *Sham*.

Degut a la poca descendència de les progenitores del grup LP0.25, juntament amb la dificultat de sexar les cries a una edat de 3 dies i especialment a la dificultat de sexar els animals a una intensitat de 0.25 lux en el moment de la separar-les de la rata progenitora, el grup LP0.25 quedà mal balancejat, amb 4 cries femella *Sham*, 5 mascles *Sham*, 5 famelles Px i només un mascle Px. Una de les famílies, però, quedà representada en tots els grups.

5.3.- RESULTATS

5.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES

Des de la Figura 34 fins la Figura 37 es poden observar les gràfiques DP individuals dels diferents animals en base a 24 hores, agrupades segons sexe, pinealectomia i intensitat de llum.

De l'observació de les gràfiques pertanyents als animals del grup LP0.25 (animals situats a 0.25 lux de llum constant), no se'n desprenen diferències degudes al sexe o a la pinealecronització. Siguin mascles o femelles, Px o *Sham*, en les seves gràfiques s'observa un patró circadiari des del primer a l'últim cicle de registre, tot i que en els primers cicles s'observa que el component circadiari és menys definit que en els posteriors, i s'hi observen a més a més components de freqüència ultradiària. El període del ritme circadiari d'activitat motora és en tots els cassos superior a les 24 hores. S'observa també en totes les gràfiques un pic d'elevada activitat tan a l'inici com al final de la fase d'activitat (i especialment important aquest últim), i entre aquests dos pics apareix en alguns animals un tercer pic no tan marcat com els primers; es poden considerar, doncs, patrons bi o tri-modals.

En les gràfiques corresponents als animals LP497 (animals situats a 497 lux de llum constant) no s'hi poden observar diferències en quant als factors sexe i pinealectomia. Tots els animals tarden al voltant de 10 dies a passar d'un patró inicialment ultradiari a un patró circadiari. El període del ritme circadiari és sempre molt superior a les 24 hores. En quan al patró que presenten els diferents animals s'observa que, independentment al sexe i a la pinealectomia, hi ha una tendència a presentar un patró unimodal o bé bimodal amb el segon component molt poc marcat, i en pocs cassos són bimodals.

5.3.2.- PERIODE DEL COMPONENT ENDÒGEN

En la Taula 10 es poden observar les mitjanes i els seus límits fiducials dels períodes obtinguts mitjançant el PSB, agrupats en funció de la intensitat de la llum, del sexe i de la pinealectomia.

En la comparació dels períodes en funció d'aquests tres factors, realitzada per ANOVA (Taula 11), s'observa que l'únic factor que influeix significativament sobre els períodes és la intensitat de llum.

Comparacions posteriors indiquen que els animals del grup LP497 presenten períodes superiors que els del grup LP0.25 ($p < 0.001$).

5.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES

L'examen visual de les matrius gràfiques mitjanes del lot LP0.25 i del grup LP497 (Figura 38) mostra grans diferències entre elles. En el grup LP0.25 s'observen uns primers cicles en els quals dominen els tres primers harmònics juntament amb els harmònics 9, 10, 11 i 12. Passats aquests cicles inicials, els harmònics ultradiaris perden la seva potència i s'estabilitza un patró en el qual destaquen els tres primers harmònics juntament amb l'harmònic 5. En la matriu gràfica mitjana dels animals del grup LP497 s'observa en els primers cicles una ampla franja de freqüències ultradiàries (hi ha elevada potència des de l'harmònic 7 al 13), i posteriorment, passats al voltant de 10 cicles passen a dominar els tres primers harmònics, i posteriorment els harmònics 1, 3, 4 i 5.

Analitzant per separat les matrius gràfiques mitjanes del grup LP0.25 en funció de si els animals són PX o *Sham*, s'observa que en la gràfica mitjana dels animals Px dominen els tres primers harmònics mentre que en la matriu gràfica mitjana dels animals *Sham* el segon harmònic és relativament menys potent i és relativament important l'harmònic 5.

Comparant visualment les gràfiques mitjanes del grup LP497 en funció del factor pinealectomia s'observa que la franja ultradiària inicial és més ampla en els animals *Sham*; que posteriorment els animals Px tenen un patró relativament constant, amb el primer i tercer harmònic dominants, mentre que els animals *Sham* tenen de dominant el primer harmònic juntament amb els harmònics 3 al 6, tot i que en aquest cas aquests harmònics tenen una potència relativament inestable.

En cap cas s'observen grans diferències pel factor sexe.**

5.3.4.- PATRÓ D'ACTIVITAT MOTORA

En la Figura 39 es poden observar els patrons mitjans dels dos grups en funció del factor pinealectomia i del factor sexe.

Es pot observar que el patró mitjà dels animals del grup LP0.25 és, tant en els animals Px com els *Sham*, un patró bimodal amb el segon pic relativament més important que el primer, mentres que en el grup LP497 els patrons tendeixen a ser unimodals. No s'observen grans diferències de patrons en funció del factor pinealectomia, com tampoc se n'observen en quant al factor sexe.**

5.3.5.- SOROLL PRESENT EN EL PATRÓ

Per tal de fer comparacions en quant al soroll present en els registres dels diferents grups d'animals, es va obtenir per cada animal el promig dels IS dels cicles 21 al 24 (s'han utilitzat només aquests dies pel fet que els registres dels altres dies presenten deficiències en un o altre animal).

A la Taula 12 es poden observar els continguts de soroll de cada grup, desglossat en funció del sexe i de pinealectomia.

En la comparació d'aquests valors mitjançant ANOVA (Taula 13) no s'obtenen diferències significatives degudes al factor pinealectomia, si que s'obtenen diferències significatives pel factor sexe (el soroll present en els mascles és superior al present en les femelles), però no s'observen diferències significatives pel factor intensitat de llum, tot i que per aquest factor hi ha una clara tendència que indica que a intensitats majors de llum el soroll tendiria a ser major ($p=0.08$).

5.3.6.- ÍNDEX D'ACTIVACIÓ/DESACTIVACIÓ

A partir del patró mitjà de cada animal s'ha determinat el seu IA/D. En la Taula 14 es poden observar els valors mitjans i els seus límits fiducials dels IA/D agrupats per grups, sexe i pinealectomia.

En l'anàlisi de la variança (Taula 15) utilitzant aquests factors s'obté que no hi ha diferències significatives ni degudes al sexe ni degudes

al factor pinealectomia, i si que n'hi ha en canvi pel factor intensitat de llum. Segons aquests resultats, la transició entre la fase d'activitat i la de repòs dels animals del grup LP0.25 és més ràpida que en els del grup LP497. En quan al factor sexe, si bé les diferències no són significatives hi ha una tendència clara dels mascles a tenir un IA/D inferior al que presenten les femelles ($p=0.056$).

5.3.7.- ÍNDEX DE CONSTÀNCIA DE PATRÓ

Per cada animal per separat s'ha determinat el seu ICP. En la Taula 16 es poden observar els valors mitjans i els seus límits dels ICP dels diferents grups, en funció de la pinealectomia i del sexe.

En la comparació per ANOVA (Taula 17) dels ICP individuals enfront del factor intensitat de llum, pinealectomia i sexe s'observa que hi ha diferències significatives pel factor intensitat de llum, no n'hi ha pel factor pinealectomia i tampoc pel factor sexe, si bé en aquest cas hi ha una clara tendència dels mascles a tenir un ICP menor al de les femelles ($p=0.07$).

En conjunt, doncs, el patró dels animals del grup LP0.25 és més constant o estable que el dels animals LP497, i el de les femelles ho és més que el dels mascles.

5.4.- DISCUSIÓ

Tot i que la glàndula pineal és una part important dins del sistema circadiari d'ocells i reptils, no és essencial per la generació dels ritmes en rosegadors. La pinealectomia té poc efecte en el patró del ritme circadiari dels animals en curs lliure (Quay 1968; Aschoff et al 1982). Tot i així sembla que la secreció de melatonina de la glàndula pineal pot influir en el sistema circadiari. Concretament s'ha descrit que la melatonina pot sincronitzar el ritme dels animals en curs lliure (Redman et al 1983) i que aquesta sincronització és dependent de la integritat dels NSQ (Cassone et al 1986). En els NSQ s'han descrit receptors per la melatonina (Weaver***). Es suposa doncs que tot i que no sigui part indispensable pel manteniment dels ritmes circadianis, si que potser és important per mantenir un efecte de retroacció sobre els NSQ i potser mantenir la estabilitat dels ritmes circadianis.

Amb aquest plantejaments vem dissenyar aquest tercer experiment, ens vem plantejar que potser potser la glàndula pineal podria tenir un paper en aquesta evolució, especialment sobre la forma i la estabilitat del ritme circadiari. Ja que a l'experiment anterior havíem vist la influència de la intensitat de il.luminació sobre el patró del ritme d'activitat motora de la rata, vem fer l'estudi en les dues intensitats de llums extremes, que en aquest cas considerem DD (0.25 lux de llum vermella) i LL (497 lux de llum blanca).

Els resultats mostren que la pinealectomia no afecta en cap dels paràmetres dels ritmes estudiats. Tal com havia estat descrit la pinealectomia no afecta el tau del animals (Cheung et al 1980), però tampoc produeix alteració pel que fa a la forma d'ona ni a la estabilitat del ritme. Cap dels index estudiats va donar diferent pel fet que els animals tinguessin o no pineal. Podem pensar doncs que la pineal no té efecte sobre la forma d'ona del ritme, per tant l'efecte de retroacció no és sobre la estabilitat del ritme manifest. De tota manera no podem descartar que ja que els animals van ser pinealectomitzats al cap de dos dies del seu neixement, podessin secretar més quantitat de melatonina per les glàndules harderianes o fins i tot per la retina (***) quedant els nivells de melatonina compensats per aquestes altre glàndules i mantenint-se el mateix efecte de feed-back sobre els oscil.ladors dels NSQ. Si això fos cert la estabilitat i la forma d'ona seria la mateixa en els grups pinealectomitzats comparats amb els grups control.

Tal com ja havíem vist a l'experiment anterior, les condicions d'il.luminació afecten tant el tau, com la forma i la estabilitat del ritme. En aquest experiment els resultats són similars als obtinguts anteriorment, la qual cosa confirma que el patró del ritme és més estable en DD, presenta una forma més quadrada i presenta menys soroll que el patró del ritme dels animals mantinguts en LL.

Pel que fa al sexe dels animals, cal dir que tot i que les diferències no han estat gaire significatives, no ho han estat per molt poc. El tau no es diferent entre mascles i femelles, però en l'IA/D i el ICP s'observa una certa tendència al dimorfisme entre sexes. Les femelles presenten un index IA/D superior al dels mascles, el que indica que els passen de la fase d'activitat a la de inactivitat de manera més sobtada. En els mascles la transició és més suau. Similarment, les femelles presentarien un patró més estable del ritme. L'unic index significativament diferent entre mascles i femelles a estat el IS. La quantitat de soroll és molt més

elevada en els mascles que en les femelles. Aixó indicaria que el patró és molt més circadiari en les femelles que en els mascles.

Cal comentar que tot i que no està indicat a l'apartat de resultats, vem fer una anàlisi de la variança per models lineals dels experiments 2 i 3 conjuntament, tenint en compte els factors pinealectomia, sexe i condicions d'il.luminació. El resultat va ser els comentats anteriorment, però el sexe va sortir significatiu. Aixó ens indica que tot i que en cap dels dos experiments per separat el factor sexe era significatiu en determinar la forma d'ona, aixó es devia únicament a un baix nombre d'animals. Per tant els index calculats en aquesta tesi ens han permès també detectar diferències en la composició del ritme circadiari d'activitat motora entre sexes, degudes a la diferent organització del sistema circadiari a la rata.

6.- EXPERIMENT 4
ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT
MOTORA DE RATES JOVES SITUADES A PATRONS ULTRADIARIS
DE LLUM/FOSCOR

6.1.- OBJECTIU

El ritmes circadianis de comportament poden sincronitzar a cicles de llum/foscors després d'haver estat en condicions de curs lliure en foscors o llum constants.

No obstant això, depenent del període del cicle de llum/foscors pot ser que els animals no arribin a encarrilar. Per l'activitat motora de la rata no es coneixen amb presisió els límits dels períodes del cicle de llum/foscors entre els quals els animals poden encarrilar. De totes maneres, hom considera que aquests valors són pròxims a les 23 i 27 hores.

El mecanisme d'encarrilament, en els mamífers en general i en la rata en concret, sembla anar lligat al nucli supraquiasmàtic, el qual és considerat l'oscil·lador principal del sistema circadiani dels mamífers. No es pot descartar, però, que la glàndula pineal tingui alguna funció en el procés de sincronització. S'han descrit receptors per la melatonina (hormona secretada entre altres per la glàndula pineal), en el nucli supraquiasmàtic.

D'altra banda, està descrit en la bibliografia que rates joves situades en condicions de llum constant des del seu neixament presenten inicialment patrons d'activitat motora no circadianis, i amb presència de components de freqüència ultradiària.

En aquest experiment s'ha estudiat l'efecte d'un patró ultradiari de llum en animals joves situats des del seu neixament en llum constant i els quals encara no presentaven un patró circadiani definit. Així mateix, s'ha estudiat si la pinealectomia influïa d'alguna manera en la resposta dels animals al patró ultradiari de llum.

6.2.- DISSENY

Amb data 7 de novembre de 1991 van arribar al laboratori 2 rates femelles de la soca Wistar, totes dues gestants, procedents d'Interfauna.

Des del moment de la seva arribada van ser col·locades en gàbies de Makrolom (50*25*12 cm), i situades en una cabina insonoritzada en condicions de llum constant. La temperatura de la cabina es mantingué en tot moment entre 20 i 24 graus C de temperatura, i els animals disposaren de pinso A03 Panlab i d'aigua de la xarxa ad libitum.

Tres dies després del part es procedí a pinealectomitzar la meitat de les cries de cada femella (animals px), i a operar l'altre meitat però sense extreure la pineal (animals Sham).

Quan les cries van assolir els 23 dies d'edat es va procedir al seu desalletament, col·locant-les en gàbies individuals de Makrolom (25*25*15 cm) i situant-les a una altra cabina insonoritzada. Les condicions de manteniment van ser les mateixes exceptuant la il·luminació, que passà a ser cíclica amb un patró de 3 hores de llum (497 lux) i 1 hora de fosc (llum vermella 0.25 lux). Ens referirem a aquests dies com a fase T4.

Des d'aquest dia es registrà l'activitat motora de les cries, mitjançant sensors òptics de feixos infrarojos, i utilitzant intervals de mostreig de 15 minuts.

Al cap de 72 dies es van canviar les condicions d'il·luminació a fosc constant (0.25 lux de llum vermella), i aquesta nova fase d'il·luminació (fase FF) durà fins al dia 107 de registre, dia en el qual finalitzà l'experiment.

Un cop sacrificats els animals es procedí a la necròpsia per tal de verificar la pinealectomia.

El número total de cries que es van utilitzar en aquest experiment va ser de 14, la meitat de les quals eren d'una progenitora i l'altre meitat de l'altre. Aquests 14 animals estaven distribuïts de la següent manera: 5 mascles sham, 3 mascles px, 2 femelles sham i 4 femelles Px. En tots els grups hi havia representants de les dues famílies.

6.3.- RESULTATS

6.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES

En les figures *** es poden observar les gràfiques DP individuals obtingudes a partir de les dades d'activitat motora.

En aquestes gràfiques es pot observar que inicialment els animals no presenten un patró circadiari definit, tot i que aquest apareix al cap de pocs cicles. En tots els cassos el component circadiari té un període superior a les 24 hores, i en tots els cassos la fase alfa d'aquest component circadiari es veu clarament modulada pel patró ultradiari d'il.luminació. Quan la fase alfa coincideix amb la fase de foscó hi ha elevats nivells d'activitat motora, mentres que quan coincideix amb la fase de llum els nivells d'activitat motora són baixos. No s'observa, en canvi, que durant la fase rho la presència de foscó faci augmentar els nivells d'activitat motora. En dos animals, (tots dos femelles Px), s'observa que el component circadiari va perdent potència fins a desaparèixer, i en aquests cassos s'observa com la fase de foscó provoca un augment d'activitat motora tant en el que seria fase alfa com en el que seria fase rho.

En la fase FF posterior a la T4 s'observa com tots els animals manifesten un component circadiari clar, que sempre té un període superior a les 24 hores excepte en el cas dels dos animals que presentaven la desaparició del component circadiari en la fase T4, que presenten un període inferior a les 24 hores.

En alguns cassos, i especialment en els dos animals en els quals el patró d'activitat es tornà ultradiari, quan els animals són deixats en curs lliure (Fase FF) sembla que hi ha continuïtat dels components ultradiaris, tot i que la relació de fases dels diferents pics d'activitat sembla no mantenir-se constant.

6.3.2.- TAUS EN LA FASE FF I EN LA FASE T4

En la Taula *** es poden observar els valors mitjans dels taus que presenten els diferents grups d'animals durant la fase FF. Els taus individuals es van calcular mitjançant el PSB, utilitzant les dades pertanyents als dies compresos entre el dia 15 i el dia 45. En l'anàlisi de

la varianza dels taus individuals front els factors pinealectomia i sexe no s'obtenen diferències significatives per cap dels dos factors (Taula ***).

En la taula *** es poden observar també els valors mitjans dels taus individuals que presentaven els animals en la fase FF, agrupats per pinealectomia i sexe. En l'anàlisi de la varianza dels taus individuals d'aquesta fase front dels dos factors, s'observa que hi ha diferències significatives pel factor pinealectomia però no pel factor sexe.

En la taula ** es poden observar els valors mitjans dels canvis de tau existents entre una i altre fase. En l'anàlisi de la varianza s'observa que la constant és significativa (és a dir, el canvi de tau és significatiu), però no hi ha efectes dels factors pinealectomia ni sexe.

6.3.3.- MATRIUS GRÀFIQUES

En la figura *** es poden observar les matrius gràfiques mitjanes de cada grup d'animals. En la fase T4 s'observa en tots els cassos hi ha inicialment un augment gradual del primer harmònic, que al cap de pocs cicles s'estabilitza, i un augment gradual també del sisè harmònic. En les femelles, a més a més, adquireix certa potència l'harmònic 12, i en el cas de les femelles Px aquest fet comporta la pèrdua de potència del primer harmònic.

En tots els cassos quan els animals són deixats en fosc constant presenten potència elevada en el primer harmònic, i disminueixen les potències dels harmònics 6 i 12.

Es podria dir, per tot això, que les femelles presenten una resposta més marcada al cicle ultradiari de llum/fosc. No s'observen diferències clares, però, pel que fa a al factor pinealectomia.

6.3.4.- POTÈNCIES DELS HARMÒNICS 6 I 12 DURANT LA FASE T4

De cada animal s'ha obtingut la mitjana de la suma de potències dels harmònics 6 i 12 dels dies 15 al 76. (S'ha de tenir en compte que per ser el patró de llum asimètric, els harmònics que el descriuen són el 6 i el 12).

En la taula *** hi ha les mitjanes dels valors obtinguts agrupats en funció del sexe i pinealectomia dels animals.

En l'anàlisi de la varianza dels valors individuals front els factors sexe i pinealectomia no s'obtenen diferències pel segon factor però si que s'obtenen diferències pel factor sexe. Les femelles presenten valors més elevats que els mascles, i per tant es pot dir que el patró d'activitat en les femelles es veu més afectat pels canvis ultradiaris de llum que el patró dels mascles.

6.3.5.- PATRÓ CÍCLIC MITJÀ DURANT LA FASE T4

En la Figura *** es poden observar les gràfiques dels patrons mitjans d'activitat motora diària dels diferents grups d'animals, calculats a partir de les dades de la fase T4.

Per obtenir els patrons mitjans primer s'han obtingut les mitjanes del patró diari (mòdul 24 hores) de cada animal, i posteriorment les mitjanes d'aquest patró mitjà en funció del sexe i pinealectomia de l'animal.

En aquest cas s'ha utilitzat el mòdul 24 hores perquè interessava visualitzar possibles diferències en quan a sensibilitat al patró de llum.

En la gràfica mitjana de cada lot s'observa que la oscil.lació té més amplitud en les femelles que en els mascles, i a més sembla que comparant les gràfiques dels animals d'igual sexe els animals px tenen una oscil.lació amb major amplitud i menor durada.

6.3.6.- TRANSISIÓ ENTRE LES FASES T4 I LES FF

Per a una bona interpretació dels components d'activitat motora presents en les fases T4, i amb la intenció de conèixer si aquests components tenen continuïtat en les fases FF s'han utilitzat tècniques de tractament d'imatge aplicades sobre les gràfiques DP.

No s'han pogut utilitzar mètodes analítics perquè, malgrat que en alguns cassos semblen visualitzar-se els components ultradiaris en la fase FF, aquests no mantenen relacions de fase estables entre ells, i per tant són difícils de quantificar. És per això que s'ha intentat ressaltar-los gràficament.

En les figures *****..... es poden observar alguns exemples d'aquests tractaments, els quals no han sigut seleccionats a l'atzar, sinó

que s'han seleccionat aquells en els quals semblava observar-se millor la continuïtat dels components.

A la part esquerra es poden observar fragments ampliat de les gràfiques DP originals, i a la part dreta es poden observar els resultats obtinguts al fer-ne el tractament.

Amb aquestes gràfiques s'observa de manera relativament clara que els components, que en alguns casos tenen una continuïtat ben manifesta, no mantenen relacions de fase estables entre ells, i sembla a més a més que tenen tendència a agrupar-se cap a la fase en la qual apareix després el component circadiari (*).

6.4.- DISCUSIÓ

En aquest experiment hem observat com les rates joves adquireixen un ritme de període circadiari independent de les condicions externes a les que està sotmès. El ritme extern actua únicament influint el període circadiari i es manifesta principalment durant la fase alfa del ritme circadiari. És destacable que no és fins al cap d'un temps relativament llarg, aproximadament uns 50 dies, que el cicle extern es manifesta, en alguns animals, també durant la fase de repòs del ritme circadiari. En aquests casos els animals segueixen totalment un ritme ultradiari de 4 hores. Això es troba especialment en dues femelles pinealectomitzades, les quals són a més les úniques que presenten escurçament del tau, que adquireix valors inferiors a les 24 hores, després d'estar sotmeses a T4. No tenim prou animals per concloure que la pinealectomia produeix més facilitat per sincronitzar a T4, però sí que els resultats ho suggereixen.

De tota manera és difícil arribar a diferenciar entre un fenomen d'encarrilament o de masking en el patró del ritme d'activitat que han adquirit aquests animals. En les dues femelles que presenten el T4 més marcat un cop es deixen en curs lliure, presenten alguns components d'activitat que provenen de la fase de foscors del T4 previ.

Pensant en un sistema multioscillador podem suggerir que els diferents pics d'activitat poden ser produïts per un determinat agrupament entre els oscil·ladors que regulen el ritme d'activitat. Si els animals són petits com en aquest cas, el sistema circadiari no està encara ben desenvolupat i a priori semblaria que els animals s'haurien d'adaptar

facilment al ritme extern. Aixó no es dona en aquest experiment, ja que el ritme circadiari es manifesta independentment del T4 extern. El fet que el T4 sigui més manifest quan l'animal es fa gran, podria indicar que cal un sistema circadiari madur que rebi les influències externes. Potser cal un sistema amb ben desenvolupat amb vies d'encarrilament ben definides.

7.- EXPERIMENT 5
ESTUDI DE L'EFECTE DE LA PINEALECTOMIA EN L'ACTIVITAT
MOTORA DE RATES ADULTES SITUADES A PATRONS
ULTRADIARIS DE LLUM/FOSCOR.

7.1.- OBJECTIU

Patrons ultradiaris. Px i Sham. Adults.

7.2.- DISSENY DE L'EXPERIMENT #5

Amb data 1 de març de 1993 van arribar al laboratori 16 rates albines de la soca Wistar, la meitat de les quals eren mascles i l'altre meitat famelles. Tots els animals tenien pesos compresos entre 130 i 150 gms, i tots ells procedien d'Interfauna.

Des del moment de la seva arribada els animals van ser situats en gàbies individuals de Makrolom (25*25*12 cm), i van ser situats en una cabina insonoritzada en la qual van romandre fins al final de l'experiment. La temperatura ambiental de la cabina es mantingué en tot moment entre 20 i 24 graus C de temperatura, i els animals disposaren de pinso A03 Panlab i d'aigua de la xarxa ad libitum.

Des del moment en què es van tenir situats els animals a la cabina insonoritzada s'inicià el registre de la seva activitat motora mitjançant sensors d'infrarojos, utilitzant intervals de mostreig de 15 minuts. El registre finalitzà passats 252 dies, que és el temps que durà l'experiment.

Inicialment la cabina es trobava en condicions de foscors constant (0.25 Lux de llum vermella), i no es van canviar aquestes condicions fins al cap de 71 dies.

Abans d'aquesta data, i concretament el dia 48 d'experiment, es procedí a la pinealectomia de la meitat dels animals de cada sexe (animals Px), i s'operaren la resta d'animals seguint el mateix protocol però sense extripar la glàndula pineal (animals Sham). Com que la operació no es podia realitzar en les condicions de foscors en les quals es trobaven els animals, i amb la intenció d'alterar al mínim possible el seu sistema circadiari, es procedí a operar-los en una cabina il·luminada però cada animal va ser operat quan es trobava a la meitat de la fase de repòs, que és el moment en el qual segons la CFR es produeixen menors canvis de fase per pulsos de llum. En tots els cassos, a més a més, s'anestesiava els animals abans de treure'ls de la seva cabina.

Al dia 71 d'experiment es van canviar les condicions d'il.luminació de la cabina, situant-la en llum constant de 497 lux.

Passats 41 dies, és a dir al dia 112 d'experiment, es sotmeté la cabina a un patró de llum/foscor ultradiari, que constava de 3 hores de llum (497 lux), i 1 hora de foscor (0.25 lux de llum vermella). Aquest patró l'anomenarem a partir d'ara patró T4.

Els animals van estar sotmesos a aquest patró durant 34 dies, passats els quals van ser sotmesos de nou a condicions de foscor constant. Passats 39 dies, és a dir al dia 185 d'experiment, es va situar de nou la cabina en un patró T4 durant 29 dies. Finalment, des d'aquest dia (dia 214 d'experiment), i fins al dia 252 els animals van restar en foscor constant.

Aquest dia es donà per acabat l'experiment, i els animals van ser sacrificats i pesats, i a més es comprovà quirúrgicament la pinealectomització.

En resum, doncs, es pot dir que per les condicions d'il.luminació l'experiment consta de 7 fases:

	NOM	LLUM	DIES
FASE 1 (abans Px)	FF1	Foscor constant	1 a 48
FASE 2 (després Px)	FF2	Foscor constant	49 a 71
FASE 3	LL	Llum constant	72 a 112
FASE 4	T4_1	T4 (L/F 3:1)	113 a 146
FASE 5	FF3	Foscor constant	147 a 185
FASE 6	T4_2	T4 (L/F 3:1)	186 a 214
FASE 7	FF4	Foscor constant	214 a 252

7.3.- RESULTATS

7.3.1.- DOBLES GRÀFIQUES

Des de la figura *** fins a la figura *** es poden observar les gràfiques DP individuals amb mòdul 24 hores, i des del primer a l'últim dia d'experiment.

Es pot observar en totes les gràfiques que en la primera fase de fosc constant els animals presenten un patró circadiari ben definit, i amb període sempre superiors a les 24 hores.

Després del dia 49 (dia en el qual els animals van ser operats) no sembla alterar-se el patró d'activitat motora dels animals, ni sembla que es produeixin canvis de fase o de tau, independentment del tipus d'operació (Px o Sham) o del sexe.

L'exepció d'aquesta generalitat es troba en un animal mascle, pertanyent teòricament al lot Px, el qual sí que presentà un clar escurçament del tau (figura *** tau curt). És important remarcar que en aquest animal el procés de pinealectomització no es pogué realitzar de forma correcta, ja que en l'intent d'extirpar la glàndula pineal es lesionà l'encèfal sense aconseguir l'objectiu.

Per les seves característiques, aquest animal fou canviat de cabina i es seguí mantenint durant 70 dies en fosc constant. L'experiment quedà des d'aquest moment reduït a 15 animals.

Al començar la següent fase (fase de llum constant), s'observa que tots els animals perden ràpidament el patró circadiari, el qual es transformà en un patró irregular que en alguns cassos sembla contenir components de freqüència ultradiària (figura *** animal 23, i animal 33...).

En la primera fase T4 els animals presenten, ja des del seu inici, un patró clarament influenciat pel cicle de llum/fosc. Totes les gràfiques segueixen presentant un elevat 'soroll' de fons, i sobreposat a aquest s'hi observa un patró ultradiari, en el qual la franja d'activitat segueix la fase de fosc del patró de llum. A diferència de l'experiment anterior, en aquest cas només un animal presenta un component circadiari

manifest (figura ***** #8), amb període clarament superior a les 24 hores. En aquest animal només s'observen nivells elevats d'activitat quan coincideix la seva fase alfa amb la fase de foscó, mentres que en les fases de llum l'activitat motora sempre es manté baixa. En les gràfiques de la resta d'animals no s'hi observa la presència del component circadiari, i s'hi observa en canvi que sempre que l'animals es troba en foscó hi ha nivells elevats d'activitat motora.

En l'inici de la següent fase (tercera fase de foscó) s'observa que tots els animals adquireixen un ritme circadiari de període superior a 24 hores i clarament inferior al que presentaven en les dues primeres fases de foscó. En alguns animals aquest component circadiari apareix ja en el primer cicle (** #??), però en la majoria d'animals hi ha una certa evolució del patró d'activitat motora, i tarda varis dies a establir-se el patró definitiu (***** #?). És important destacar, també, que en la majoria d'animals, i especialment en aquells en els quals el patró circadiari no s'estableix ràpidament, sembla que els pics d'activitat que anaven associats a la fase de foscó durant el T4 es mantenen algun cicle, i inclús sembla que tendeixin a concentrar-se cap a la fase en la qual s'inicia cicles més tard el component circadiari (** #83).

Passada la tercera fase de foscó, en iniciar-se la segona fase T4 s'observa com hi ha una alteració instantània del patró d'activitat motora, i tornen a aparèixer els pics d'activitat motora associats a la foscó. En aquest cas es poden observar els components circadiaris endògens en 6 dels 15 animals. A l'igual que en el cas anterior, en aquests animals només s'hi observen valors elevats d'activitat motora quan coincideixen la fase alfa i la de foscó, mentres que la resta d'animals presenten activitat motora relativament elevada sempre que hi ha foscó. En tots els casos, també, en aquesta fase les gràfiques presenten un elevat soroll de fons.

Finalment, la última fase de foscó constant presenta característiques similars a la tercera fase de foscó: alguns animals adquireixen ràpidament un component circadiari, mentres que altres tarden un cert nombre de cicles en adquirir-lo.

En aquests últims, s'hi observa també amb relativa facilitat la continuïtat dels pics d'activitat que anaven associats amb els pics de foscó.

7.3.2.- TAUS DURANT LES FASES DE FOSCOR CONSTANT

De cada animal s'ha calculat el període del seu ritme d'activitat motora en les diferents fases de l'experiment en les quals l'animal presenta un ritme circadiari manifest. Tots els animals han presentat períodes significatius en les diferents fases de fosc constant (fases 1, 2, 5 i 7), però en cap cas s'han trobat períodes circadiaris significatius en les altres fases, malgrat que segons s'ha descrit a partir de les gràfiques DP alguns animals presenten un ritme circadiari clar en les fases T4. En aquests casos el període no ha resultat significatiu degut al gran enmascarament que sofreix el patró d'activitat motora pels efectes del patró ultradiari de llum.

En la figura *** es poden observar, per cada fase de fosc constant, els períodes mitjans i els seus errors estàndar dels diferents grups d'animals: mascles Px, mascles Sham, femelles Px i femelles Sham.

En la comparació dels taus que presenten els animals abans i després de la operació (fases FF1 i FF2), comparació feta amb el test de la t de Student per dades aparellades, s'obtenen diferències significatives ($p < 0.01$) que indiquen que el tau després de la operació és més gran que abans de l'operació. Aquest increment, però, no depèn del tipus d'operació al qual es sotmet l'animal (Px o Sham) i per tant es pot interpretar que és degut a la pròpia operació.

Comparant els taus que presenten els animals en les fases FF2 i FF3 s'observa una significativa disminució, interpretable sens dubte pel fet que anteriorment a la fase FF3 hi ha hagut fases amb intensitats de llum elevades. Tampoc en aquest cas els factors sexe o pinealectomia influeixen en la magnitud de l'increment.

Entre les fases FF3 i FF4 no hi ha diferències significatives de taus, cosa que fa pensar que les variacions de tau presents entre les fases FF2 i FF3 són degudes als efectes de la primera fase T4, sense que la fase de llum anterior a aquesta hagi influït posteriorment en els taus presentats pels animals.

7.3.3.- MATRIUS GRAFIQUES

En la figura *** hi ha representades les matrius gràfiques mitjanes de cada grup d'animals en funció dels factors sexe i pinealectomia.

cada matriu gràfica individual va ser calculada amb un període de 24 hores i des del primer a l'últim dia de registre.

En totes elles s'observa una presència important dels primers harmònics durant les fases de fosc constant. En la fase de llum constant (tercera fase), s'observa que els primers harmònics perden la seva potència, malgrat que en molts cassos (***) mirant individuals**) els harmònics 4 i 5 semblen mantenir una potència relativament elevada.

En les dues fases T4 s'observa una potència elevada dels harmònics 6 i 12. S'ha de tenir en compte que el cicle de llum fosc en aquestes fases no és simètric, i que són precisament els harmònics 6 i 12 els que descriuen el patró de llum.

Es pot observar també que el canvi de distribució de potències que es produeix entre les fases T4 i les posteriors fases FF no és instantània, sinó que els primers harmònics tarden cert nombre de cicles en adquirir potències elevades.

7.3.4.- POTÈNCIES DELS HARMÒNICS 6 I 12 DURANT LES FASES T4

Per tal de determinar la influència del cicle de llum fosc de les fases T4 sobre els animals, s'ha calculat per cada animal i en cada una de les dues fases T4 la mitjana de la suma de potències dels harmònics 6 i 12. (Taules ** i **)

En l'anàlisi de la varianza d'aquestes mitjanes en funció del factor sexe i pinealectomia s'observa que, tant en la primera fase T4 com en la segona, no hi ha diferències significatives pel factor pinealectomia i si que hi ha en canvi grans diferències pel factor sexe (Taules ** i **). En les dues fases les femelles mostren pels harmònics estudiats una potència més elevada que els mascles, i per tant es pot dir que els animals d'un i altre sexe responen diferent als canvis ultradiaris de llum.

Comparant els valors obtinguts per cada animal en una i altre fase mitjançant el test t de Student per dades aparellades no s'observen diferències significatives, i en l'anàlisi de la varianza de les diferències en funció dels factors sexe i pinealectomia tampoc s'obtenen diferències significatives per cap dels dos factors.

7.3.5.- PATRÓ MITJÀ DIARI D'ACTIVITAT MOTORA DURANT LES FASES T4

Per cada animal i per cada una de les dues fases T4 s'ha obtingut el seu patró d'activitat mitjà amb mòdul 24 hores. Posteriorment, per cada grup d'animals en funció de pinealectomia i sexe s'ha obtingut el patró diari mitjà, que es pot veure representat a la figura ***.

En aquestes gràfiques s'ha representat també el patró de llum, per tal de que es pugui comparar visualment el patró d'activitat motora en funció del patró de llum.

En aquestes gràfiques es pot observar que en les femelles la oscil·lació que segueix el patró de llum és molt més marcada que en els mascles, fet que ratifica els resultats de l'apartat anterior.

En aquestes gràfiques sembla que, almenys en les femelles, la relació de fases entre el patró d'activitat i el patró de llum difereix en funció de les fases T4 analitzades: en la primera fase T4 sembla que l'acrofase d'activitat dels animals sigui posterior a la de fosc, mentre que en la segona fase T4 sembla estar més avançada.

Per poder contrastar aquest fet s'han ajustat mitjançant el CSR els patrons mitjans de cada animal a una gràfica sinusoidal de 240 minuts de període (període del cicle de llum fosc), obtenint d'aquesta manera el valor numèric de l'acrofase. Per tal de tenir una bona referència de fases es va utilitzar l'acrofase del cicle de llum/fosc.

En l'anàlisi de la variança de les acrofases obtingudes en funció dels factors Pinealectomia, sexe i número de fase T4 no s'obtenen diferències significatives pel factor pinealectomia però sí degudes als altres dos factors. Comparacions posteriors indiquen que els mascles presenten acrofases posteriors a les que presenten les femelles, i que les acrofases que presenten els animals durant la primera fase T4 són posteriors a les de la segona fase T4.

Cal tenir present, en aquest cas, que en tots els casos les acrofases obtingudes estaven allunyades de 360°, i per tant ens moviem en un rang central de l'esfera horària. De no ser així, els resultats anteriors no podrien considerar-se vàlids.

7.3.6.- CONDUCTA ANTICIPATÒRIA

Per tal de determinar si existeix conducta anticipatòria dels animals respecte la fase de fosc, s'ha determinat per cada fase T4 la mitjana de l'activitat motora present en els 45 minuts anteriors a cada inici de fosc i la mitjana de l'activitat motora dels 45 minuts anteriors a aquests. S'ha calculat, llavors, per cada animal i fase T4, les diferències entre el primer valor i el segon. Aquesta nova variable d'increment d'activitat (IA) és la que s'ha utilitzat per determinar si hi havia o no conducta anticipatòria.

En la Taula ** es poden observar els valors mitjans i errors dels IA obtinguts en la primera fase T4, agrupats en funció del factor pinealectomia i factor sexe.

En l'anàlisi de la variança d'aquests valors (Taula **) s'observa que existeix anticipació (la constant és significativa), no existeix significació pel factor pinealectomia i tampoc pel factor Sexe, tot i que en aquest cas hi ha una tendència clara per part de les femelles a tenir més anticipació que els mascles ($p=0.11$).

De la mateixa manera, en la Taula ** es poden observar els valors mitjans i errors dels IA obtinguts en la segona fase T4, agrupats en funció del factor pinealectomia i factor sexe.

En l'anàlisi de la variança d'aquests valors (Taula **) s'observa que hi ha una clara tendència a existir anticipació ($p=0.052$), no hi ha diferències pel que fa al factor pineal i tampoc n'hi ha pel factor sexe, tot i que en aquest cas, a l'igual que en l'anterior, sembla que les femelles podrien tenir més anticipació que els mascles ($p=0.050$).

7.3.7.- PESOS DELS ANIMALS AL FINAL DE L'EXPERIMENT

En la Taula ** es poden observar els pesos dels animals al final de l'experiment, agrupats en funció del sexe i de la pinealectomia.

En l'anàlisi de la variança d'aquests valors (Taula **) es pot observar que existeixen diferències significatives pel factor sexe (els mascles tenen un pes superior) i també existeixen diferències significatives pel factor pinealectomia (els animals Px presenten un pes superior al dels animals Sham).

7.3.8.- TRANSISIÓ ENTRE LES FASES T4 I LES FF

Per a una bona interpretació dels components d'activitat motora presents en les fases T4, i amb la intenció de conèixer si aquests components tenen continuïtat en les fases FF s'han utilitzat tècniques de tractament d'imatge aplicades sobre les gràfiques DP.

No s'han pogut utilitzar mètodes analítics perquè, malgrat que en alguns cassos semblen visualitzar-se els components ultradiaris en la fase FF, aquests no mantenen relacions de fase estables entre ells, i per tant són difícils de quantificar. És per això que s'ha intentat ressaltar-los gràficament.

En les figures *****..... es poden observar alguns exemples d'aquests tractaments, els quals no han sigut seleccionats a l'atzar, sinó que s'han seleccionat aquells en els quals semblava observar-se millor la continuïtat dels components.

A la part esquerra es poden observar fragments ampliat de les gràfiques DP originals, i a la part dreta es poden observar els resultats obtinguts al fer-ne el tractament.

Amb aquestes gràfiques s'observa de manera relativament clara que els components, que en alguns cassos tenen una continuïtat ben manifesta, no mantenen relacions de fase estables entre ells, i sembla a més a més que tenen tendència a agrupar-se cap a la fase en la qual apareix després el component circadiari.

7.4.- DISCUSIÓ

Els animals poden sincronitzar a cicles de llum-fosc sempre dins d'uns marges d'encarrilament. A l'experiment 1 hem vist com els animals sincronitzen a cicles de llum-fosc propers al seu tau. Pel que fa a cicles de freqüència molt allunyada de la freqüència circadiana, s'ha vist com els animals poden sincronitzar a alguns cicles que siguin múltiples o submúltiples de la freqüència circadiana (Pittendrigh i Daan 1976). D'aquesta manera els animals poden sincronitzar a cicles de 12 hores o de 48 hores, però sempre adquirint un ritme circadiari de 24 hores. Quan els cicles són molt diferents apareix en un ritme en curs lliure independent

del cicle extern imposat, però que potser sigui modificat o enmascarat pel cicle extern.

Tot i que la glàndula pineal no té un paper important en la adquisició del ritme sí que està descrit el seu paper en la sincronització a cicles externs. Les rates pinealectomitzades poden resincronitzar millor el seu ritme d'activitat motora que les rates control (Quay 1970).

A la vista d'aquests fets, hem volgut en aquest experiment observar la capacitat de sincronització a cicles curts, però submúltiples del ritme de 24 hores, de la rata. Com que la pineal té un paper en la sincronització hem estudiat rates normals i altres pinealectomitzades. A l'experiment anterior havíem observat algunes rates joves arribaven a sincronitzar amb el cicle de T4 i a modificar el seu tau després d'estar sota aquestes condicions. En aquest experiment hem estudiat la capacitat de sincronització a T4 en animals adults.

Tal com era d'esperar (Cheung 1980), la pinealectomia no afecta el ritme d'activitat motora de la rata, però no hem trobat que afectés ni al patró circadiari ni a la sincronització a T4. Hem trobat que el tau s'escurça després de la primer fase de T4, però es manté en aquest valor després de la segona fase de T4. Això ens fa pensar que el T4 d'alguna manera ha influït en el sistema circadiari de l'animal. Es evident que al passar de FF a T4 no només varia el cicle, sinó també la intensitat de la llum. Els animals es troben sotmesos a una quantitat de llum. De tota manera la quantitat de llum hauria d'influir incrementant el tau ja que com s'ha vist en experiments anteriors i tal com està descrit a la bibliografia el tau incrementa al passar de llum a fosc. El fet que el tau disminueixi ho associem més a l'efecte de la sincronització o del masking.

Aschoff (1982) no va trobar diferències entre la corba de fases de resposta a polsos de llum d'animals pinealectomitzats comparats amb els animals control. Va concloure que si la CFR no variava era que el mecanisme d'encarrilament no era afectat i que les diferències existents en la resincronització dels animals pinealectomitzats no eren res més que degudes a una major sensibilitat al masking produït per la llum.

En el nostre cas no hem trobat diferències entre els animals Px i control, però sí que si comparem l'efecte del T4 en els animals adults respecte als animals joves de l'experiment anterior, observarem com en els adults la pinealectomia afecta molt més. Sembla doncs que els animals

adults siguin molt més sensibles a canvis en les condicions ambientals o potser tenen més desenvolupades les vies per les quals es produeix "masking". El sistema circadiari dels animals joves al estar encara en fase de maduració, tendeix a generar un ritme circadiari independentment de les condicions externes i per aquest motiu resulta menys afectat per l'enmascarament.

Cal constatar que durant les fases de T4, s'observa el component endògen per sota el l'activitat generada pel T4, tot i que a través del períodegrama no s'ha pogut detectar cap component circadiari significatiu.

Altres vegades en aquest experiment tornem a observar diferències degudes al sexe. Les femelles, independentment de la pinealectomia, presenten una oscil·lació molt més marcada del component de 4 hores, la qual cosa s'observa per la forma d'ona i pel major contingut de potència dels harmònics 6 i 12. Aquesta diferència podria ser altre cop deguda a una major sincronització o a una major sensibilitat als efectes de masking dels cicles de T4. De tota manera els nostres resultats suggereixen que realment els animals han sincronitzat als cicles curts i no es tracta només de masking. En tots els casos es presenta un component d'activitat que anticipa la fase de foscor, sent aquest component més elevat en les femelles sobre tot en la segona fase dels T4. El fet que hi hagi anticipació ens fa pensar en que els oscil·ladors que regulen el ritme d'activitat motora de la rata poden variar la seva relació de fases fins a generar un patró de 6 oscil·lacions per dia.

Cal destacar també el fet que l'efecte del T4 sigui inferior en la segona fase d'exposició a aquest ritme. En la segona fase s'observa amb més intensitat el component circadiari subjacent al T4. Això fa pensar en l'efecte de les condicions previes a T4. En el primer cas els animals havien estat en situació de LL, que poden produir desacoplament entre els oscil·ladors que regulen el ritme d'activitat. En el segon cas els animals van ser sotmesos a T4 provenint de condicions de FF, en la que els oscil·ladors estan agrupats manifestant-se un ritme circadiari ben definit. Es per tant que en el primer cas, al estar els oscil·ladors desacoblats poden reorganitzar-se millor en funció del cicle extern, essent més difícil en el segon cas.

8.- CONCLUSIONS

Dels resultats de l'experiment presentat en aquest treball es poden obtenir les següents conclusions:

- Els animals poden sincronitzar a cicles de llum-fosc de períodes entre 22 i 28 hores quan estan es deixen des del desalletament sota aquestes condicions.

El fet que fins ara no s'havien descrit marges d'encarrilament tant llargs en la rata, pot ser deguda a que normalment els marges d'encarrilament s'han descrit en animals adults i no en animals joves. No necessàriament el sistema circadiari de joves ha de respondre igual que el d'adults.

- Es poden observar dos components d'activitat en el ritme d'activitat motora de la rata.

La presència dels dos components és una de les principals aportacions del nostre treball i ens indica que el RAM de la rata està regit per al menys dos oscil·ladors o grups d'oscil·ladors, un d'ells encarrilable pels cicles de llum-fosc i l'altre independent d'aquest cicle. Aquests components són molt més visibles quan els animals estan sotmesos a cicles curts, el que suggereix que la majoria d'oscil·ladors tene una freqüència superior a les 24 hores.

- El component no encarrilable per la llum determina la fase de sortida del tau en els animals sotmesos a T22.

Cal destacar que en els demès grups la fase de sortida del tau té relació amb la fase del component encarrilable per la llum, sent aquesta la mateixa per tots els animals de cada grup. En els T22 hi ha una dispersió de les fases de sortida dels taus dels animals.

- Els dos components són independents entre ells.

Això es pot concloure pel fet que no es presenta variació de la fase de cap dels components segons la relació de fases amb l'altre. De tota manera quan hi ha interacció entre els dos components l'activitat és molt més elevada. Això ens suggereix una interacció dels dos oscil·ladors en el sistema de sortida.

- El tau en FF depèn de les condicions externes a que ha estat sotmés el animal.

La relació entre els tau en FF i el període del cicle extern, T, previ segueix una relació de tipus exponencial de tercer ordre.

- La forma del ritme d'activitat motora depèn del període del cicle extern.

Hem observat com la forma d'ona no es manté constant sota els diferents cicles de llum fosc variant de forma gradual a mida que s'allarga el cicle.

- La fase alfa s'allarga a mida que incrementa el període del cicle extern.

Aquesta conclusió contrasta amb el que s'havia descrit fins ara que la fase alfa s'escurçava al fer-se T més gran. Això es degut a que el primer component del ritme d'activitat motora s'allarga i es fa més pla, fent difícil establir l'inici del de la fase alfa.

- Els components ultradiaris no depenen directament de la longitud del cicle extern.

Els components ultradiaris semblen ser conseqüència del diferent acoplament entre els oscil·ladors que regulen el ritme i aquest acoplament és diferent segons la longitud del cicle extern.

- Els index IA/D, ICP i IS són eines útils per quantificar la forma d'ona del ritme i establir comparacions entre grups.

L'index IA/D ens permet quantificar com té lloc la transició entre la fase d'activitat i la d'inactivitat. L'ICP resulta útil per conèixer l'estabilitat de la forma del ritme i el IS ens indica el grau de soroll o dispersió del component circadiari.

- L'intensitat de llum influeix sobre la forma i la evolució del ritme d'activitat motora.

Els animals mantinguts sota 0.25 lux presenten abans el ritme circadiari i presenten una forma d'ona bimodal més ben definida. A mida que incrementa la intensitat es presenta una ona més suau en les transicions, amb més soroll i amb menys constància de patró.

- La pinealectomia realitzada als dos dies d'edat no afecta en el desenvolupament del ritme d'activitat motora de les rates, ni en la forma del ritme.

Els animals pinealectomitzats segueixen la mateixa evolució que els animals control en el ritme d'activitat motora, presentant la mateixa forma un cop adults.

- La forma del ritme d'activitat motora és diferent segons el sexe. Les femelles presenten un patró amb transicions d'activitat/inactivitat més sobtades, més estabilitat en el patró del ritme i amb menys soroll que en el cas dels mascles.
 - Els animals adquireixen el ritme circadiari independentment de les condicions externes.
Tan els animals mantinguts en LL com els mantinguts sota cicles de T4 han assolit un ritme circadiari. Això indica que l'evolució del sistema circadiari en animal jove es produeix funcionalment fins a assolir el ritme circadiari característic de l'animal adult.
 - La pinealectomia no afecta a la sincronització dels animals a T4.
Aquesta afirmació és bàsicament en animals adults. En animals joves, els animals en els que els efectes del T4 han estat més visibles han estat dues femelles pinealectomitzades.
 - L'influència dels T4 en el ritme d'activitat motora es més evident en els animals adults.
Els animals adults resulten més afectats pel T4, això ho associem a una major sensibilitat als canvis en les condicions externes, mentre que en els animals joves el desenvolupament del sistema circadiari té lloc sigui qualsevol les condicions externes.
 - Els T4 influeixen molt més el ritme d'activitat motora de les femelles que el dels mascles.
Potser les femelles poden sincronitzar millor a cicles curts o potser són més sensibles a l'enmascament de la llum.
 - Els resultats donen suport a un sistema multioscillador que regula el ritme d'activitat motora de la rata, canviant l'acoplament entre els oscil·ladors segons les condicions ambientals d'il·luminació.
-

9.- BIBLIOGRAFIA

Aschoff J, Gerecke U, Von Goetz Ch, Groos GA, Turek FW (1982). Phase responses and characteristics of free-running activity rhythms in the golden hamster: Independence of the pineal gland. Dins de "Vertebrate circadian system" (Aschoff J, Daan S, Groos G, eds), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Aschoff J (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25:11-26.

Aschoff J (1988). Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. Dins de Trends in chronobiology (Hekken WThJM, Kerkhof G i Rietveld W, eds). Oxford: Pergamon Press 149-62.

Aschoff J (1981). Free-running and entrainment circadian rhythms. In Handbook of behavioral neurobiology. vol 4: Biological rhythms. (Aschoff J, ed). plenum press, New York.

Aschoff J (1965). Response curves in circadian periodicity. Dins de Circadian clocks (Aschoff J, ed). Amsterdam: North-Holland 95-111.

Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH (1965). Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. J. Biol. Chem. 240:945-954.

Binkley S, Mosher K (1985). Direct and circadian control of sparrow behaviour by light and dark. Physiol. Behav. 35:785-797.

Boulos Z, Rosenwasser AL, Terman M (1980). Feeding schedules and the circadian organization of behaviour in the rat. Behav. Brain Res. 1:39-65

Boulos Z, Terman M (1979). Splitting of the circadian rhythms in the rat. J. Comp. Physiol. 134:75-83.

Buttner D, Wollnik F (1984). Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat. Behav. Gen. 14:137-152.

Cambras T, Díez-Noguera A (1990). Evolution of rat motor activity circadian rhythm under three different light patterns. Physiol. Behav. 49:63-68.

Cassone VM, Roberts MH, Moore RY (1987). Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 81:29-34.

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM (1986b). Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Physiol. Behav.* 36:1111-1121.

Cheung PW i McCormack (1982). Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian rhythm of the rat. *Am. J. Physiol.* 11:R261-R262.

Daan S, Pittendrigh CS (1976a). A functional analysis of the circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 106:253-266.

Daan S, Pittendrigh CS (1976b). A functional analysis of the circadian pacemakers in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant light: homeostasis or frequency?. *J. Comp. Physiol.* 106:267-290.

Davis FC, Menaker M (1980). Hamsters through time's window: temporal structure of hamster locomotor rhythmicity. *Am. J. Physiol.* 239:R149-R155.

Davis FC, Darrow JM, Menaker M. (1983). Sex differences in the circadian control of hamster wheel-running activity. *Am. J. Physiol.* 244:R93-R105.

Davis FC (1981a). Ontogeny of circadian rhythms. *Dins de Handbook of behavioral neurobiology. vol 4: Biological rhythms.* (Aschoff J, ed). plenum press, New York.pp 257-270. .

Decoursey PJ, Buggy J (1986). Restoration of locomotor activity in SCN-lesioned golden hamsters by transplantation of fetal SCN. *Neurosci. Abst.* 12:210.

Díez-Noguera A. (en premsa). A functional model of the circadian system based on the degree of intercommunication in a complex system. *Am. J. Physiol.*

Eastman C, Rechtschaffen A (1983). A circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. *Physiol. Behav.* 31:417-427.

Feldman JF (1971). New mutations affecting circadian rhythmicity in *Neurospora*. Dins de *Biochronometry*, Menaker M, ed., Washington DC, Natl. Acad. Sci. pp 652-656

Fiske VM (1941). Effect of light on sexual maturation, estrous cycles, and anterior pituitary of the rat. *Endocrinology*, 29:187-196.

Gander PH, Moore-Ede MC (1983). Light-Dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. *Am. J. Physiol.* 245:R927-R934.

Gibbs FP (1980). Temperature dependence of rat circadian pacemaker. *Am. J. Physiol.* 241:R17-R20.

Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148:333-346.

Green DJ, Gilette MU (1982). Circadian rhythm of firing rate record from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. 245:198-200.

Güldner FH (1983). Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp. Brain Res.* 50:373-376.

Güldner FH (1982). Sexual dimorphisms of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 28:145-150.

Hastings JW, Sweeney BM (1957). On the mechanism of temperature independence in a biological clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43:804-811.

Hoffman RA, Reiter RJ (19..). Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat. Rec.* 153:19-22.

Honma K, Hiroshige T (1978). Endogenous ultradian rhythms in rats exposed to prolonged continuous light. *Am. J. Physiol.* 235:R250-R256.

Honma K, Honma S, Hiroshige T (1985). Response curve, free-running period and activity time in circadian locomotor activity of rats. *Jap. J. Physiol.* 35:643-657.

- Meijer JH, Rietveld WJ (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69:671-707.
- Minors DS, Waterhouse JM (1989). Masking in humans: the problem and some attempts to solve it. *Chronobiol. Int.* 6:29-53.
- Moore RY (1982). The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends in Neurosciences* 5:404-407.
- Moore RY (1992). The enigma of the geniculohypothalamic tract: Why two visual entraining pathways?. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 23:144-152.
- Morin LP, Fitzgerald KM, Zucker I (1977). Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythm. *Science* 196:305-307.
- Pittendrigh CS (1981b). Circadian systems: Entrainment. Dins de *Handbook of behavioral neurobiology*. vol 4: Biological rhythms. (Aschoff J, ed). plenum press, New York.pp 95-124.
- Pittendrigh CS, Daan S (1976b). A functional analysis of the circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as a clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291-331.
- Pittendrigh CS, Daan S (1976a). A functional analysis of the circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.* 106:223-252.
- Pittendrigh CS, Caldarola PC (1973). General homeostasi of the frequency of circadian oscillations. *PRoc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2697-2701.
- Pittendrigh CS (1981a). Circadian systems: General perspective. Dins de *Handbook of behavioral neurobiology*. vol 4: Biological rhythms. (Aschoff J, ed). plenum press, New York.pp 57-77.
- Rea MA (1989). Light increases fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nulei. *Brain Res. Bull.* 23:577-581.
- Redman JR, Armstrong SM, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219:1089-1091.
-

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM (1986a). Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J. Biol. Rhythms* 1:219-229.

Reppert SM, Schwartz WJ (1984). The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J. Neurosci.* 4:1677-1682.

Rietveld WJ, Minors DS, Waterhouse JM (1993). Circadian rhythms and masking: An overview. *Chronobiol. Int.* 10:306-312.

Rietveld WJ (1992). Neurotransmitters and the pharmacology of the suprachiasmatic nuclei. *Pharmac. Ther.* 56:119-130.

Rossenwasser AM, Pelchat RJ, Adler NT (1984). Memory for feeding time: possible dependence on coupled oscillators. *Physiol. Behav.* 32:25-30.

Rossenwasser AM, Adler NT (1986). Structure and function in circadian timing systems: evidence for multiple coupled circadian oscillators. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10:431-448.

Rusak B, Groos G (1982). Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science Wash. DC* 215:1407-1409.

Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H (1984). Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci. Res.* 1:67-74.

Siebert U, Wollnik F (1991). Wheel-running activity rhythms of two inbred strains of laboratory rats under different photoperiods. *Physiol. Behav.* 50:1137-1143.

Terman M, Terman J (1985). A circadian pacemaker for visual sensitivity?. *Ann. NY Acad. Sci.* 453:147-161.

Terman JS, Terman M (1980). Effects of illumination level on the rat's rhythmicity of brain self-stimulation behaviour. *Behav. Brain Res.* 1:507-519.

Turek FW, Gwinner E (1982). Role of hormones in the circadian organization of vertebrates. Dins de Vertebrate circadian systems (Aschoff J, Daan S, Groos GA, eds). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. J. Neurosci. 9:2581-2590.

Wollnik F (1985). Sex differences in the daily pattern of locomotor activity in laboratory rats. Naturwissenschaften 72:158.

Zucker I, Fitzgerald KM, Morin LP (1980). Sex differentiation of the circadian system in the golden hamster. Am. J. Physiol. 238:R97-R101.

10.- FIGURES I TAULES

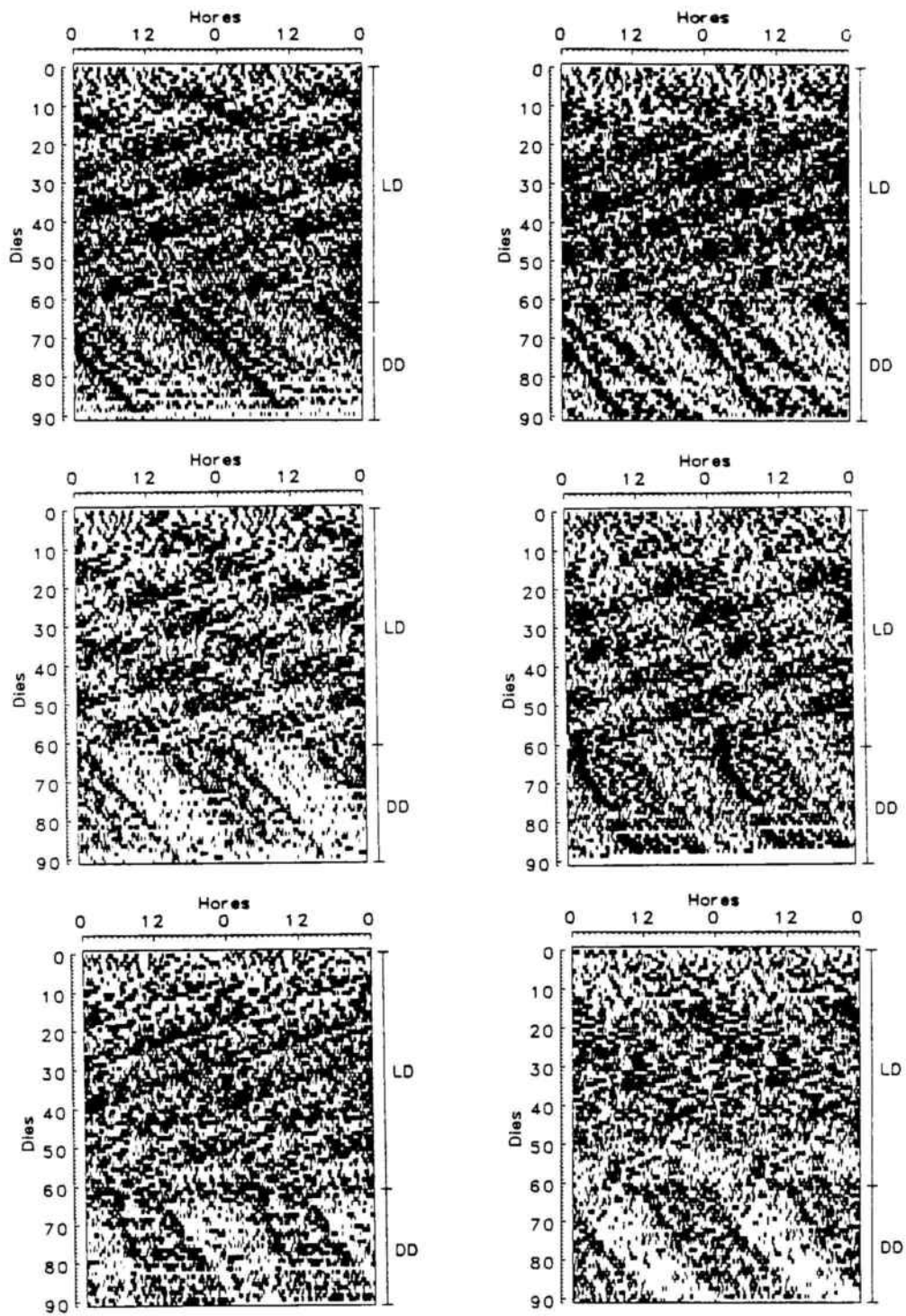


Figura 1. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 22 hores de període (T22). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

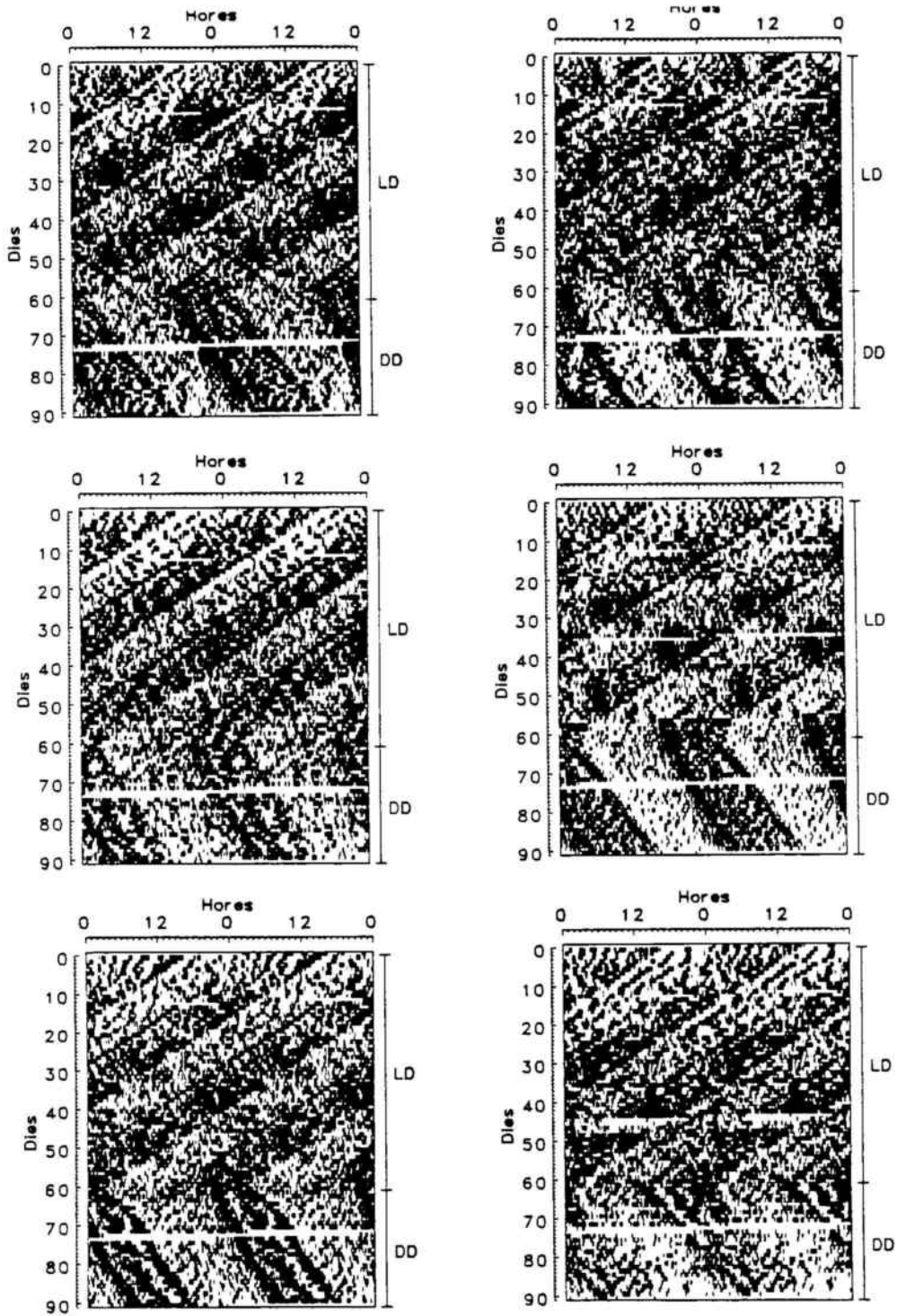


Figura 2. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 23 hores de període (T23). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

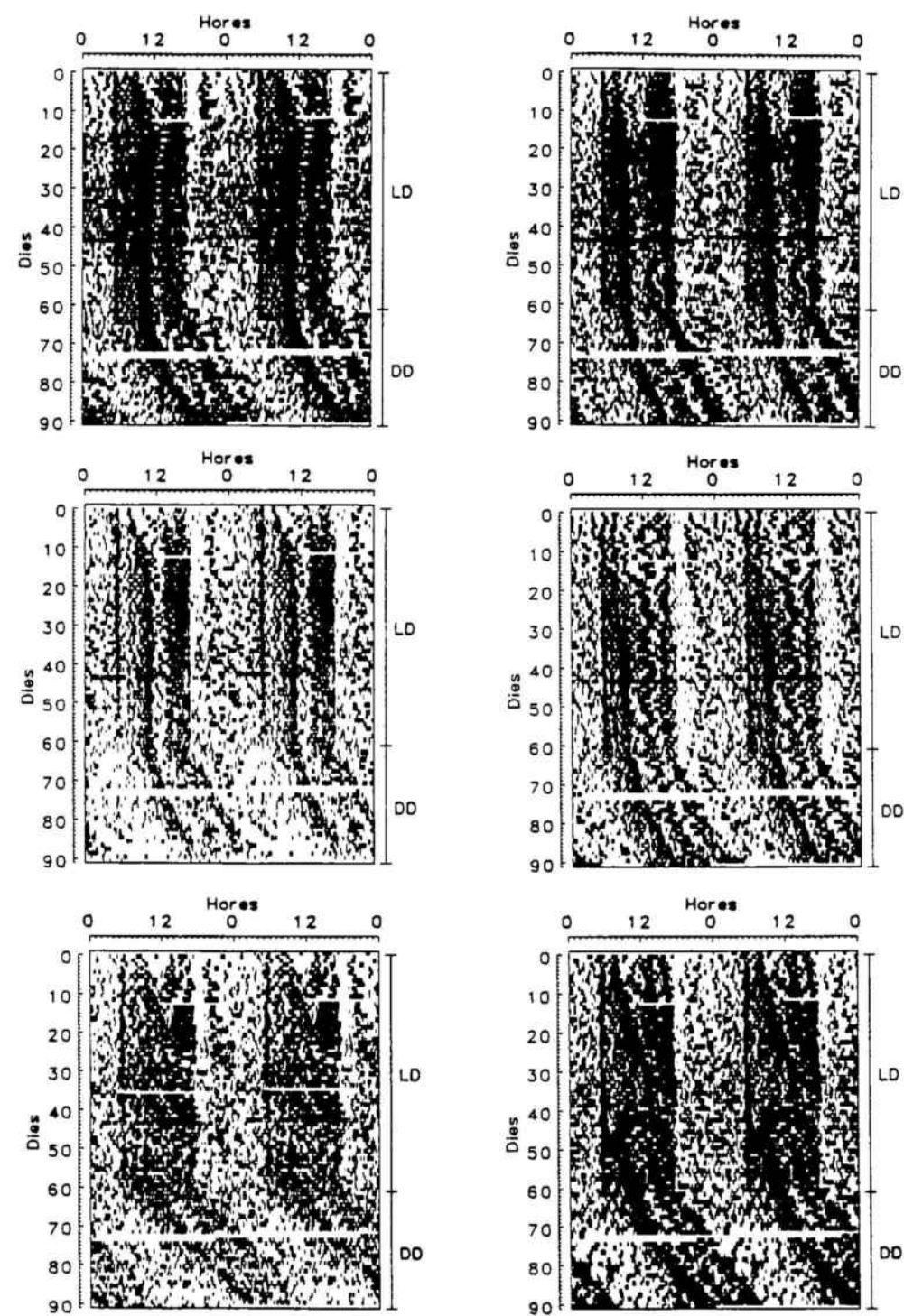


Figura 3. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 24 hores de període (T24). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

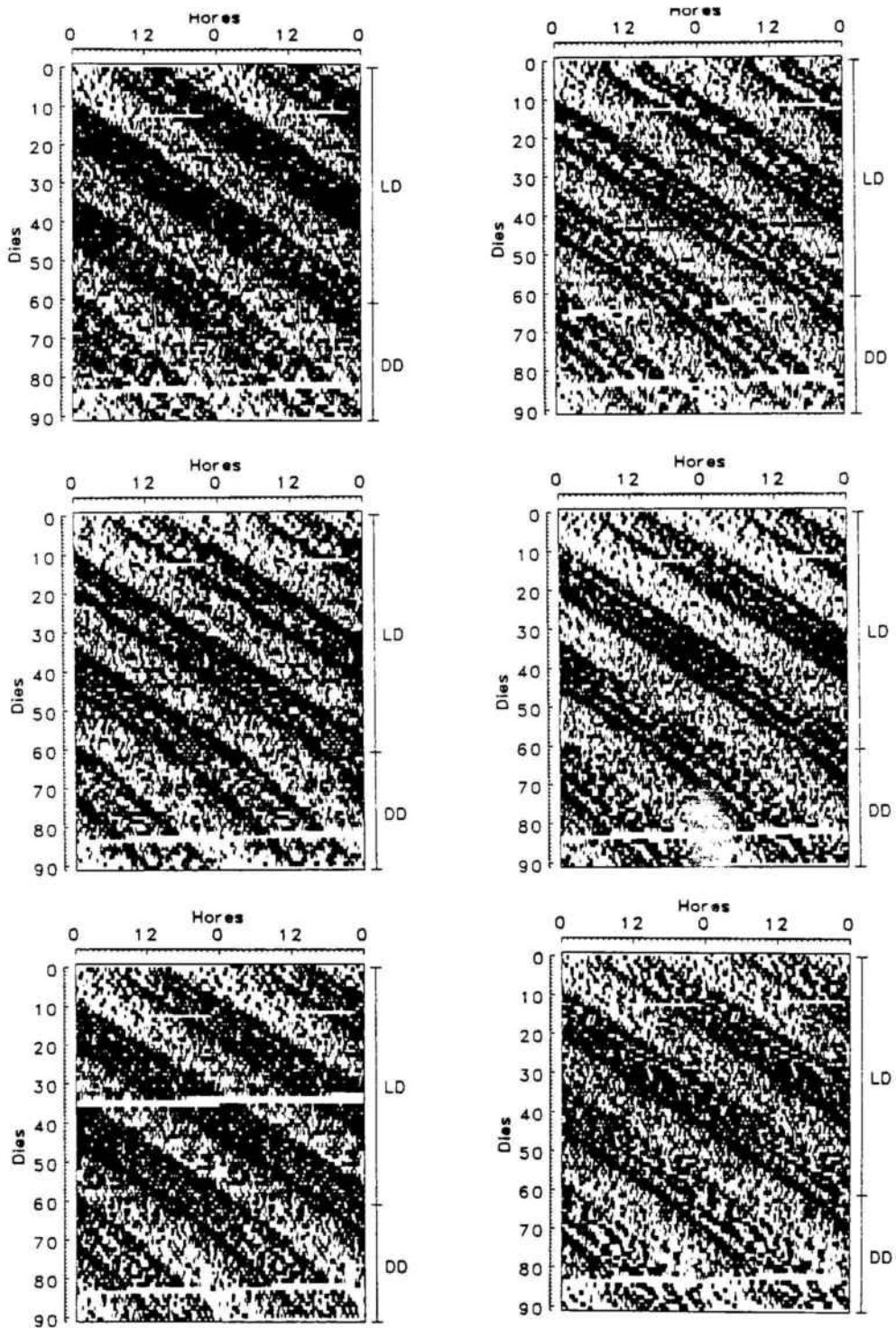


Figura 4. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 25 hores de període (T25). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

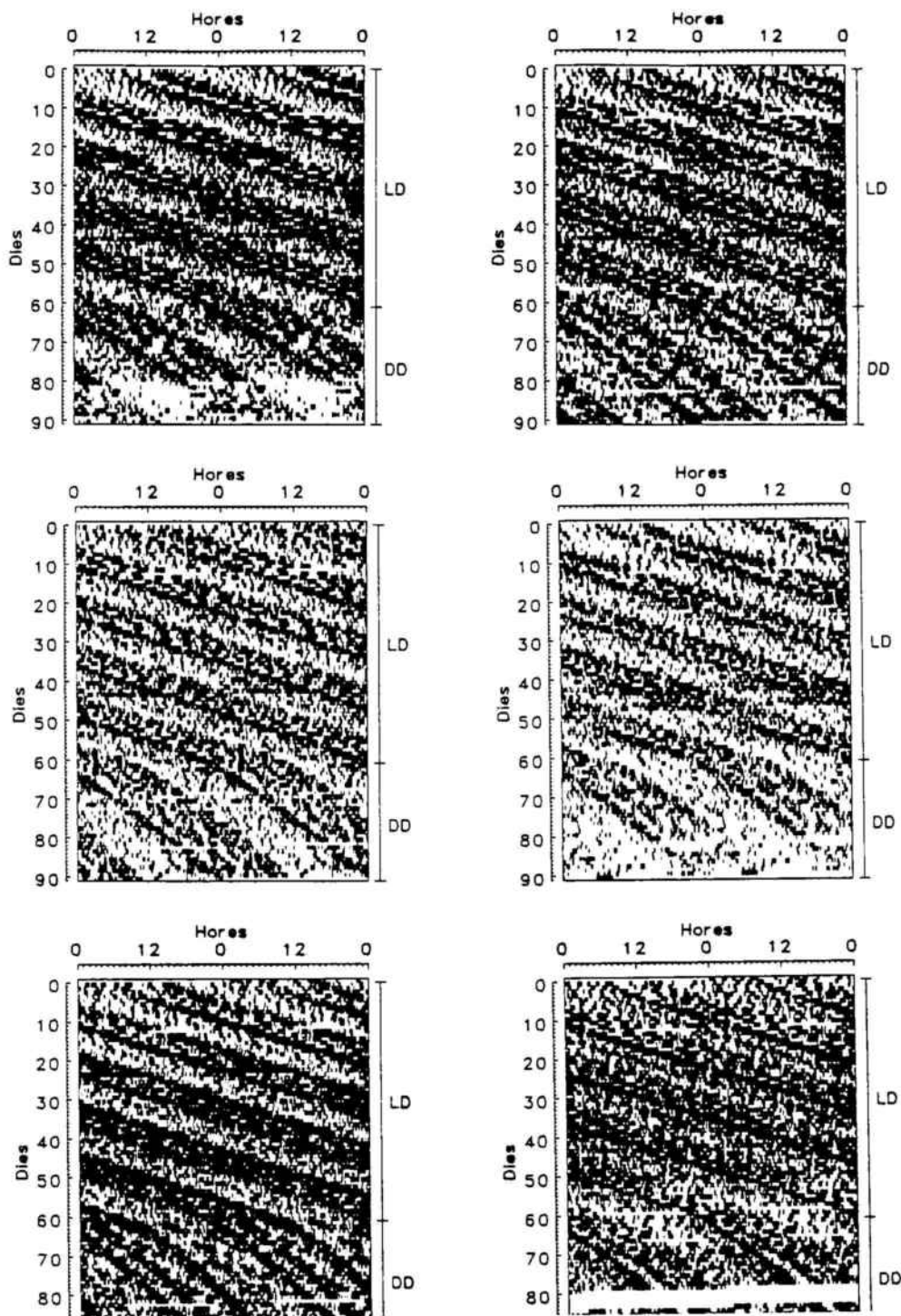


Figura 5. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 26 hores de període (T26). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

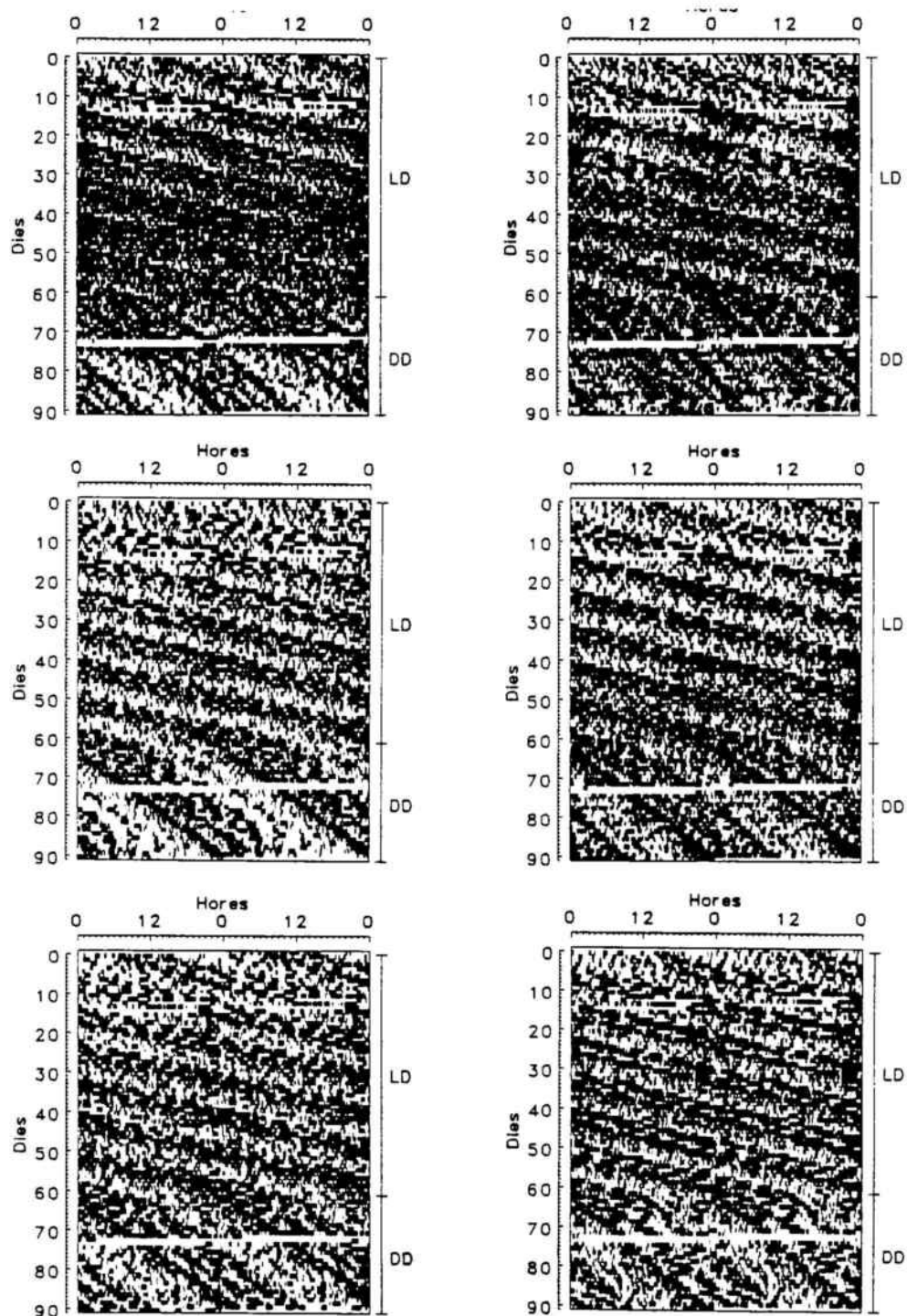


Figura 6. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 27 hores de període (T27). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

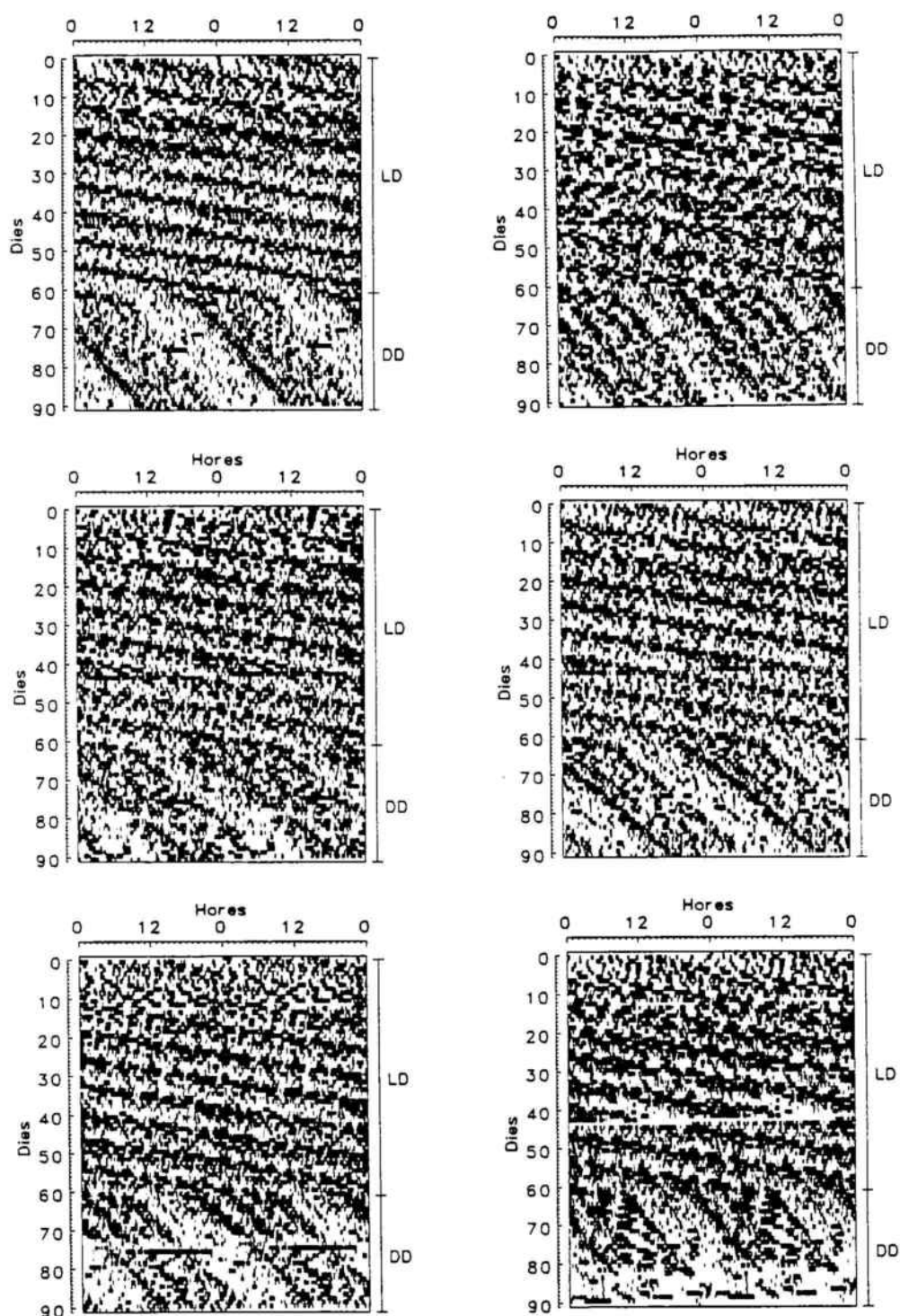


Figura 7. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 28 hores de període (T28). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

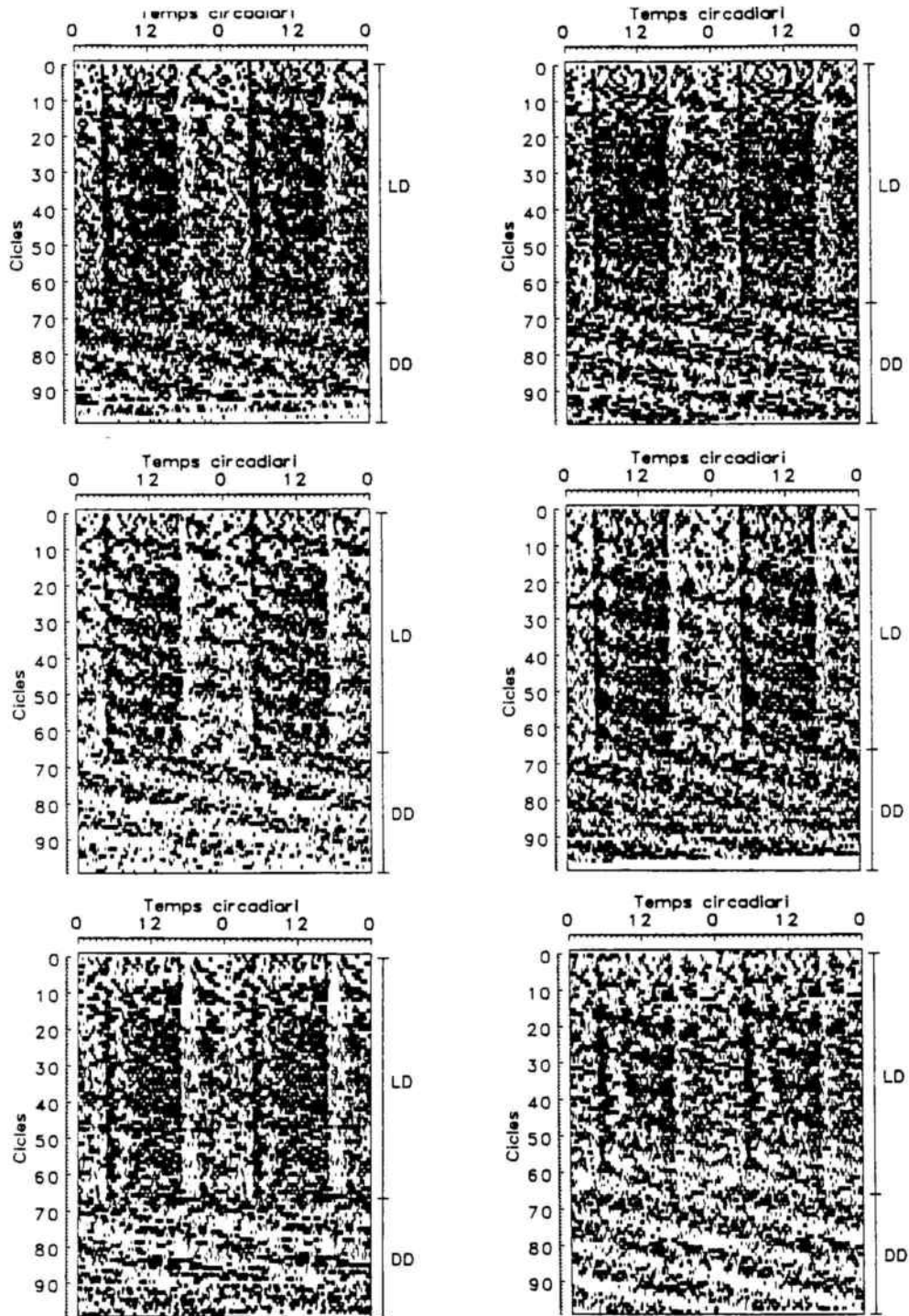


Figura 8. Dobles gràfiques en mòdul 22 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 22 hores de període (T22). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

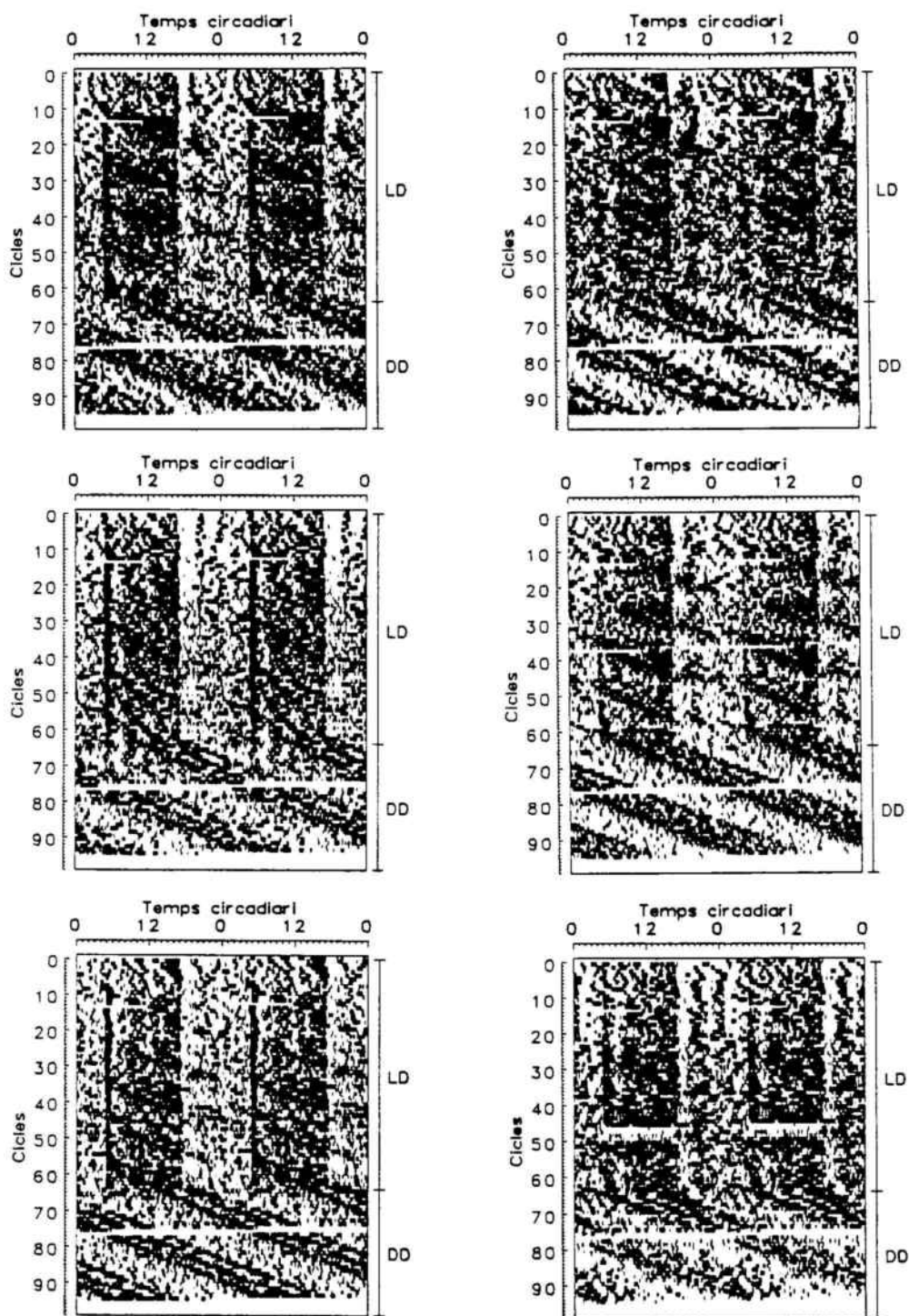


Figura 9. Dobles gràfiques en mòdul 23 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 23 hores de període (T23). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

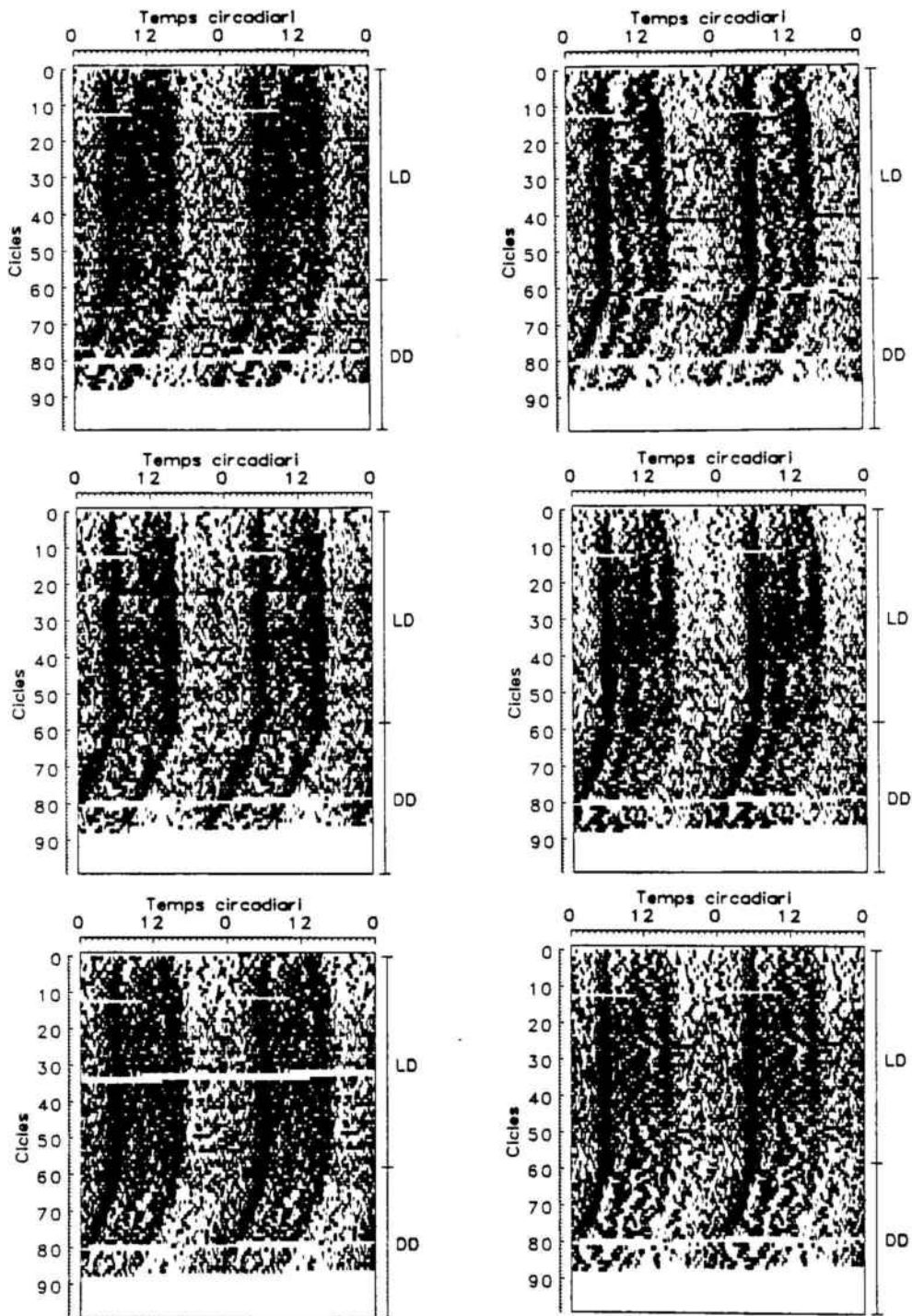


Figura 10. Dobles gràfiques en mòdul 25 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 25 hores de període (T25). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

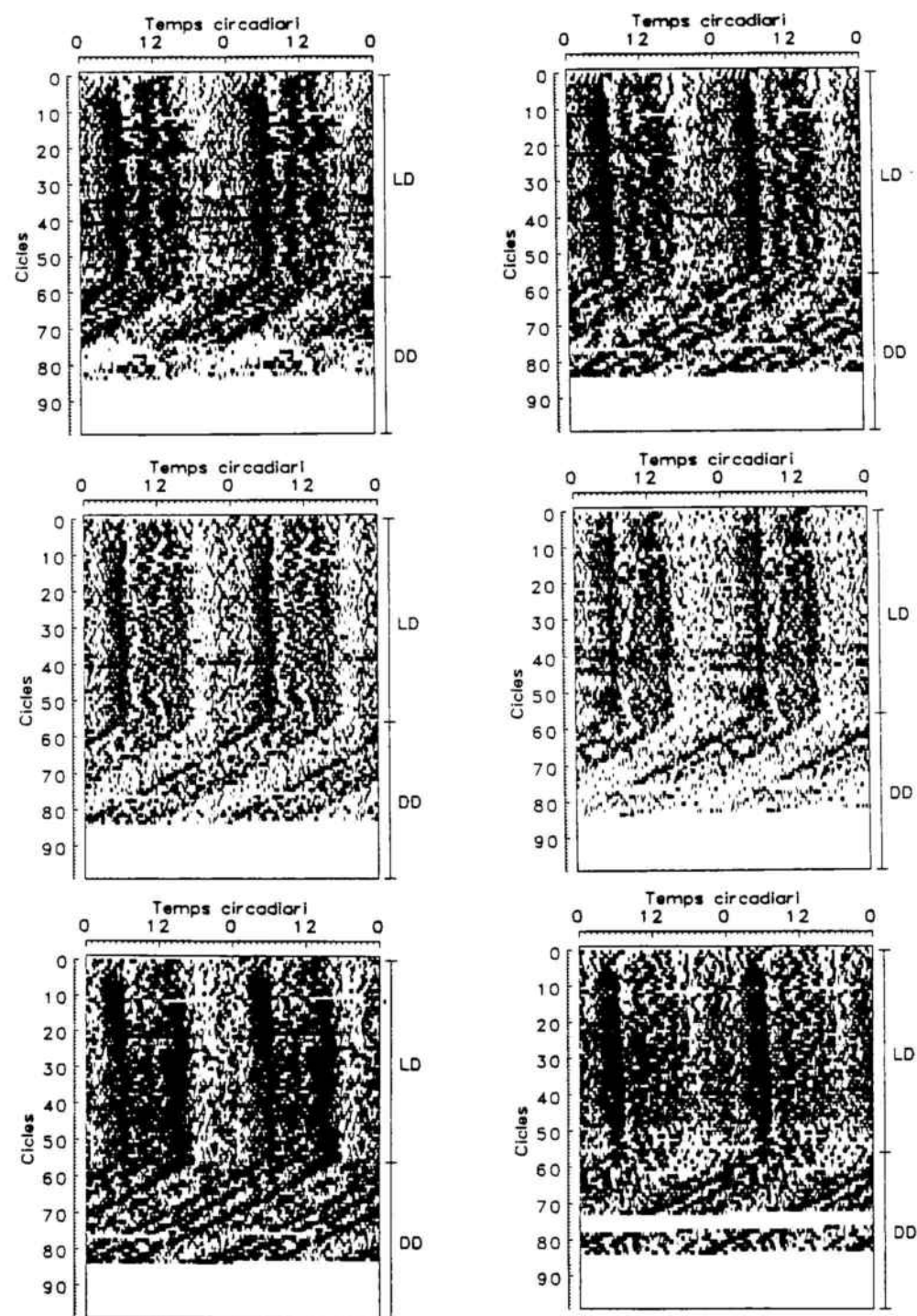


Figura 11. Dobles gràfiques en mòdul 26 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 26 hores de període (T26). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

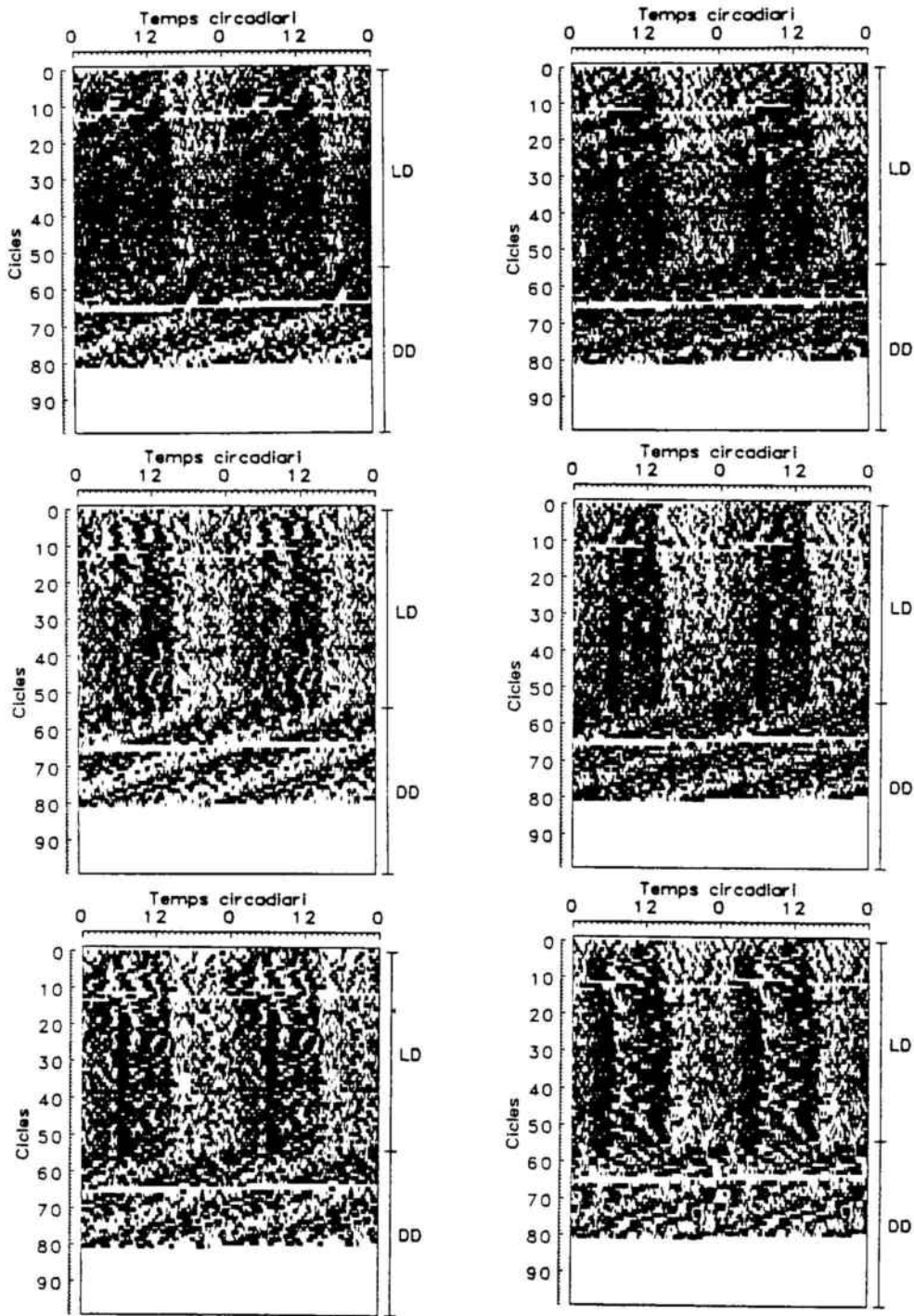


Figura 12. Dobles gràfiques en mòdul 27 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 27 hores de període (T27). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de fosc constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

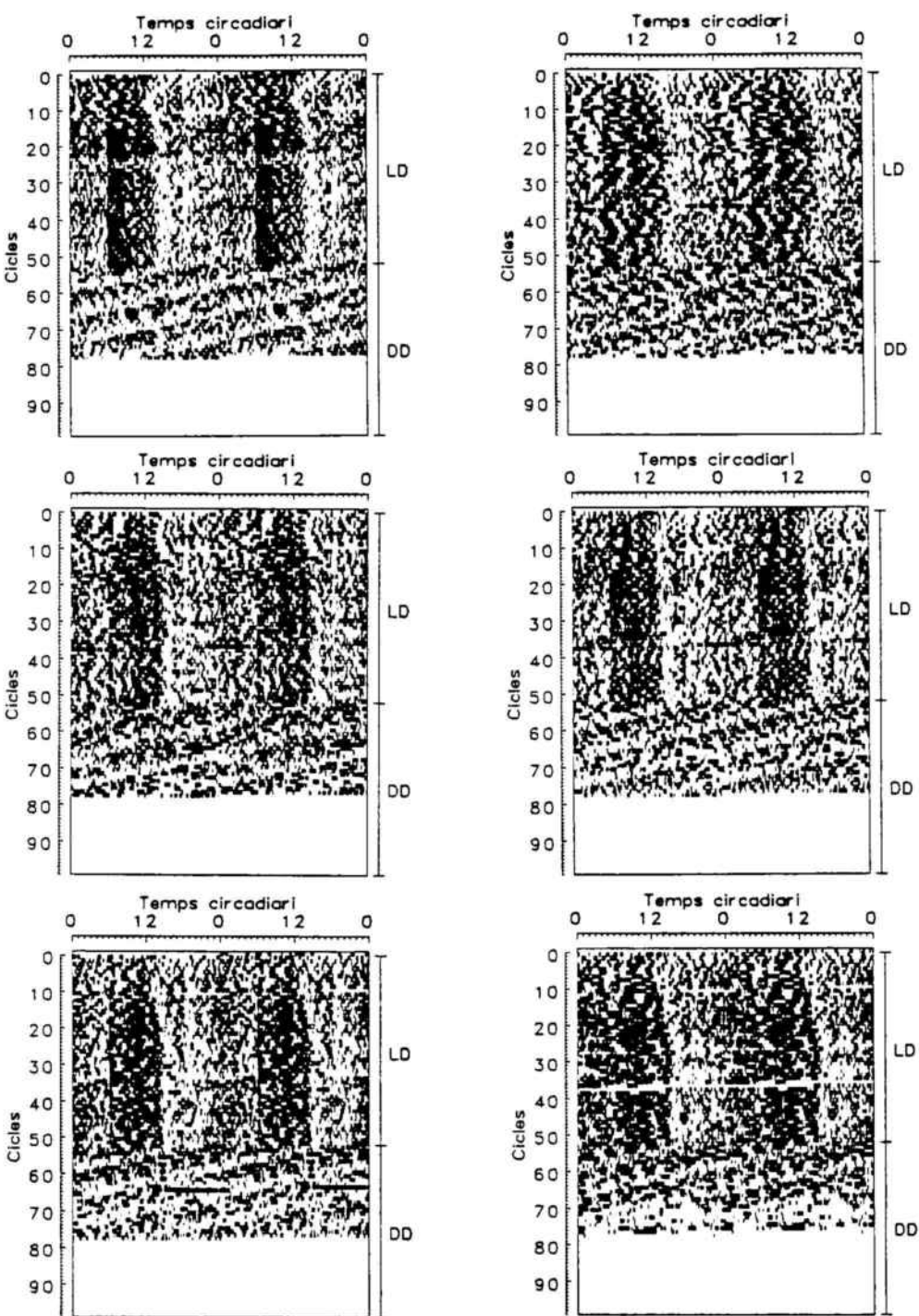


Figura 13. Dobles gràfiques en mòdul 28 hores, dels animals mantinguts sota cicles simètrics de 28 hores de període (T28). A partir del dia 60 els animals es van deixar en condicions de foscor constant. A cada fila hi han representades 48 hores.

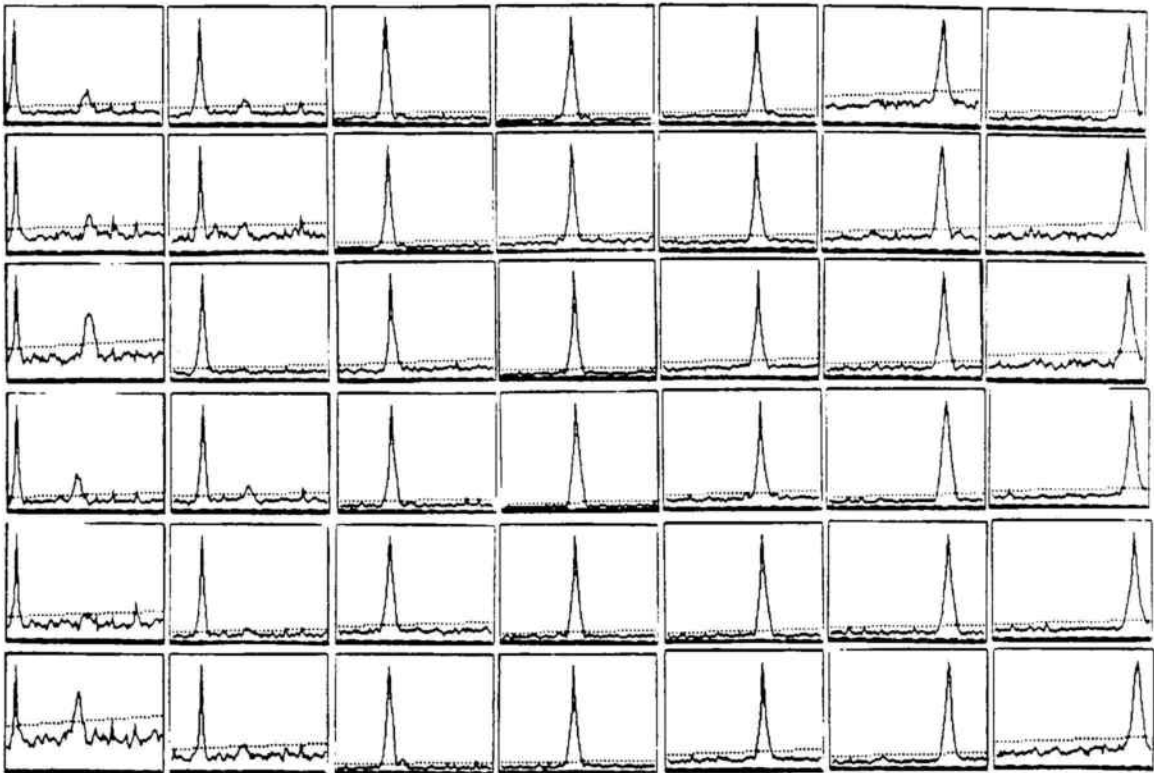


Figura 14. Representació gràfica dels periodogrames corresponents als dies 0 a 60. L'interval d'exploració va de 21.5 h (1290 min) fins a 28.5 h (1710 min) amb increments de 5 min. La línia de punts representa un nivell de significació $p=0.05$. Cada columna correspon a un patró d'il·luminació. Els pics més significatius corresponen a T.

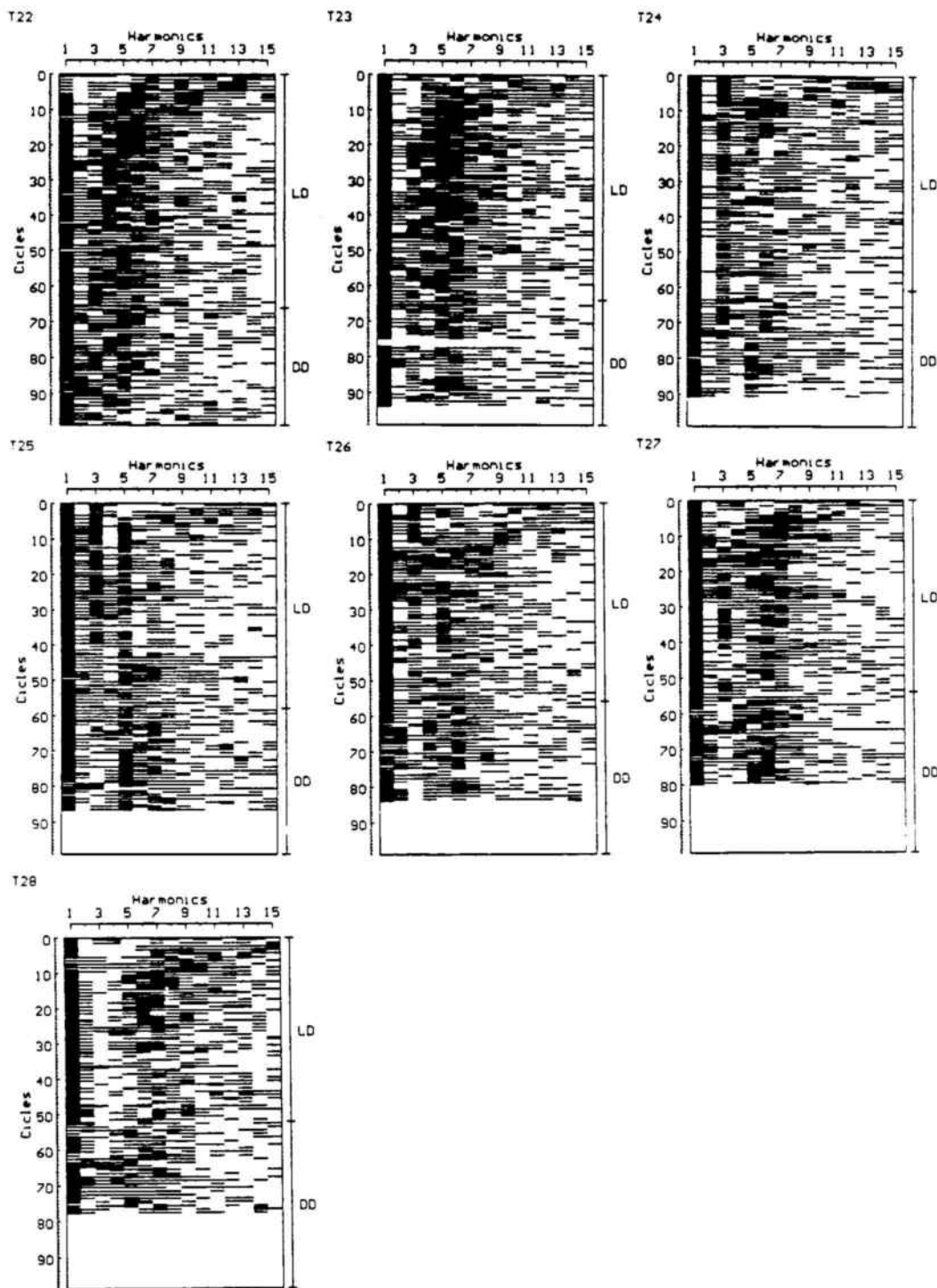


Figura 15. Matrius gràfiques mitjanes dels sis animals de cada condició d'il.luminació, corresponents als dies 0 a 60. Els espectres de potència han estat calculats en base al període exògen. Cada ratlla representa una potència del 2%.

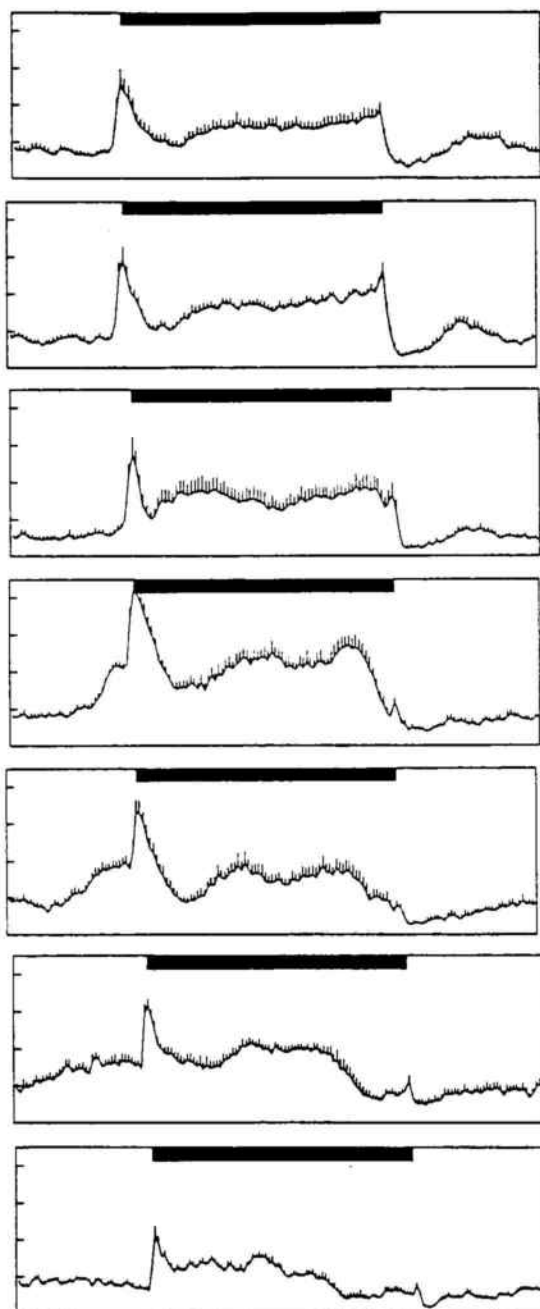


Figura 16. Formes d'ona mitjanes sota cada condició d'il·luminació calculades a partir de les formes mitjanes de cada animal. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries (les mateixes a totes les gràfiques) i el temps com a temps circadiari. L'interval correspon als dies 0 a 60 en que els animals es trobaven en LF.

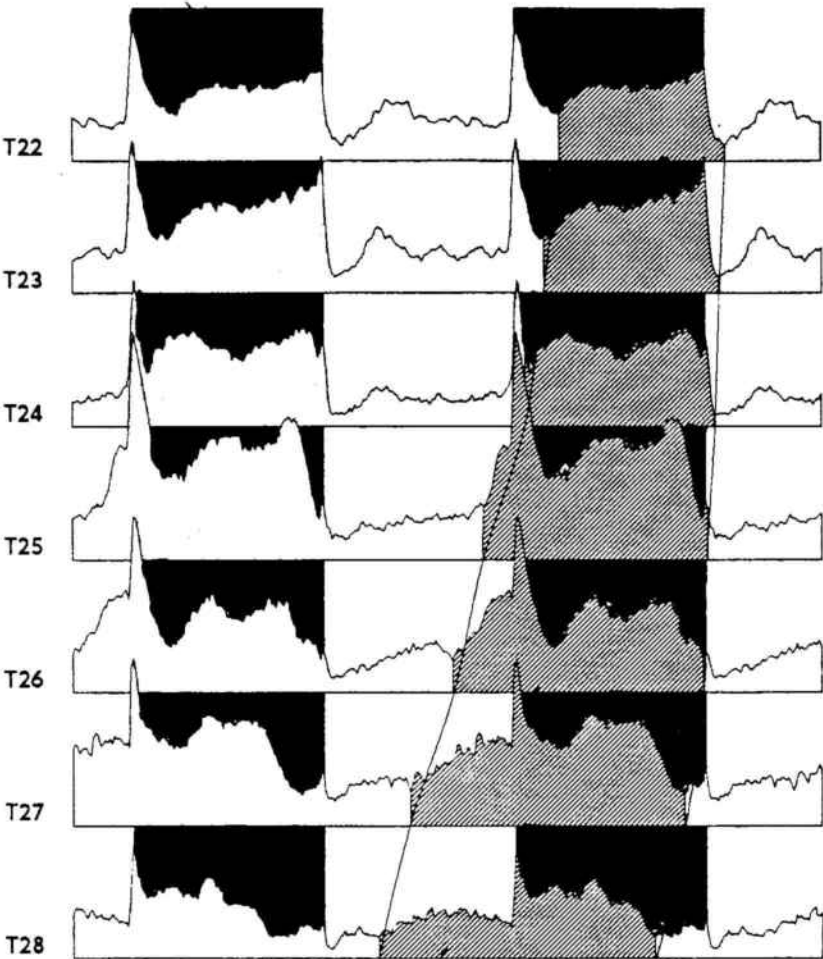


Figura 17. Doble gràfic de les formes d'ona mitjanes de la figura anterior. Es mostra la variació de la fase alfa (zona ratllada) i la seva relació amb la fase de fosc per a cada període extern T.

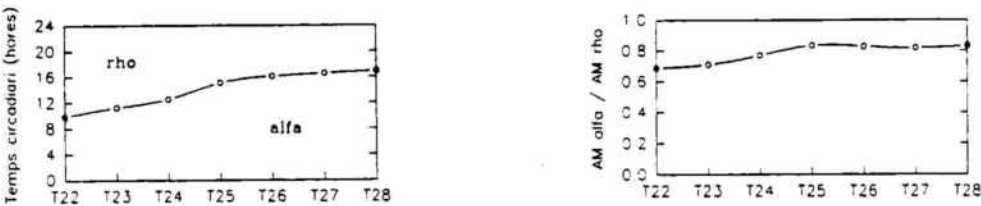


Figura 18. Representació de la relació entre les fases alfa i rho. A) en valors absoluts (temps circadiari) i B) com a cocient entre l'activitat motora durant la fase alfa i la fase rho.

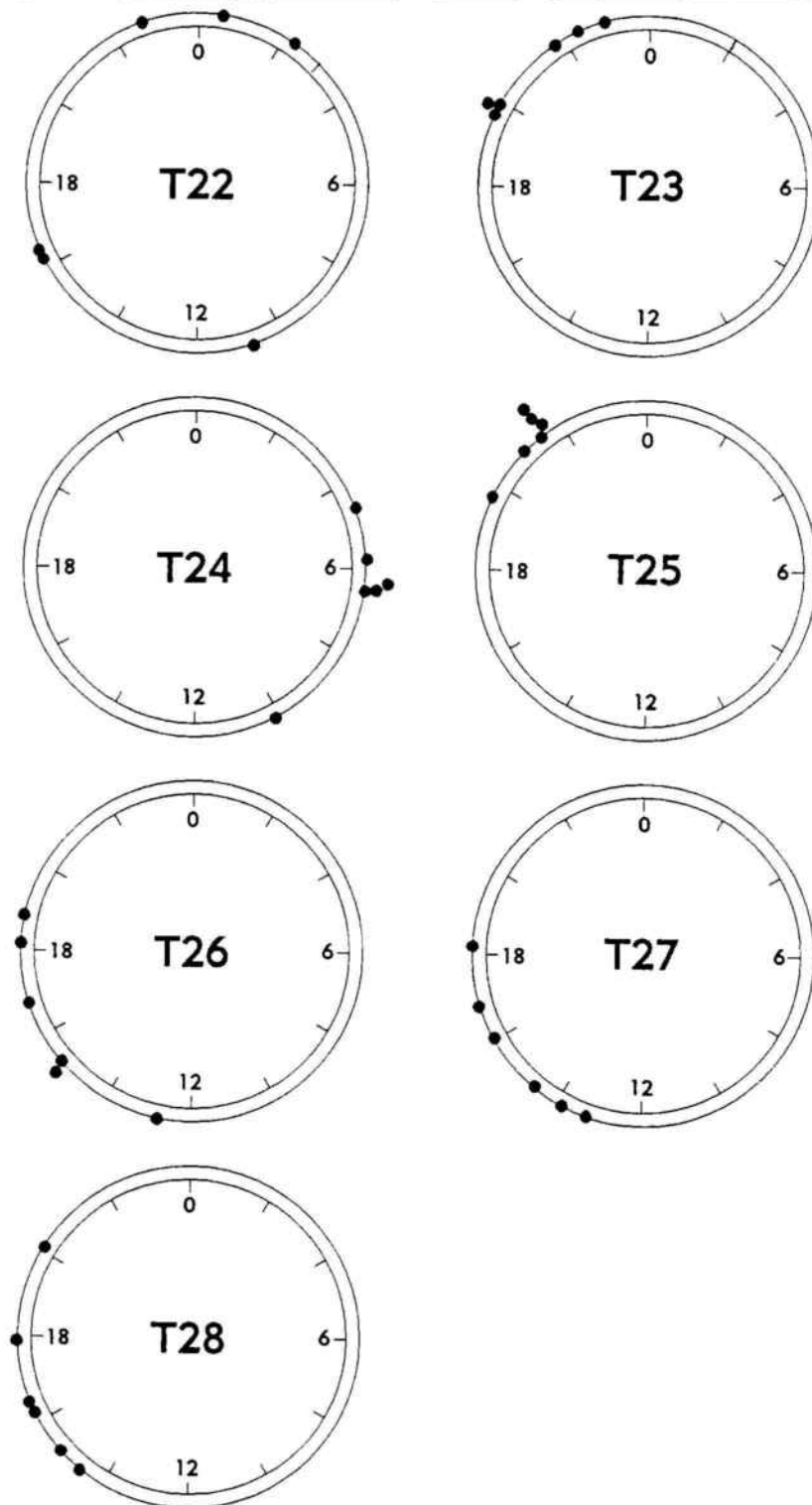


Figura 19. Fases de sortida al posar els animals en FF. Totes les fases estan calculades en base a l'hora local. Cada punt correspon a l'acrophase d'un animal.

Tau en foscor constant							
	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28
m	1470.3	1465.2	1461.8	1484	1491	1486.8	1477.5
es	3.92	2.50	3.12	1.03	3.02	2.90	3.10
n	6	6	6	6	6	6	6

Taula 1.

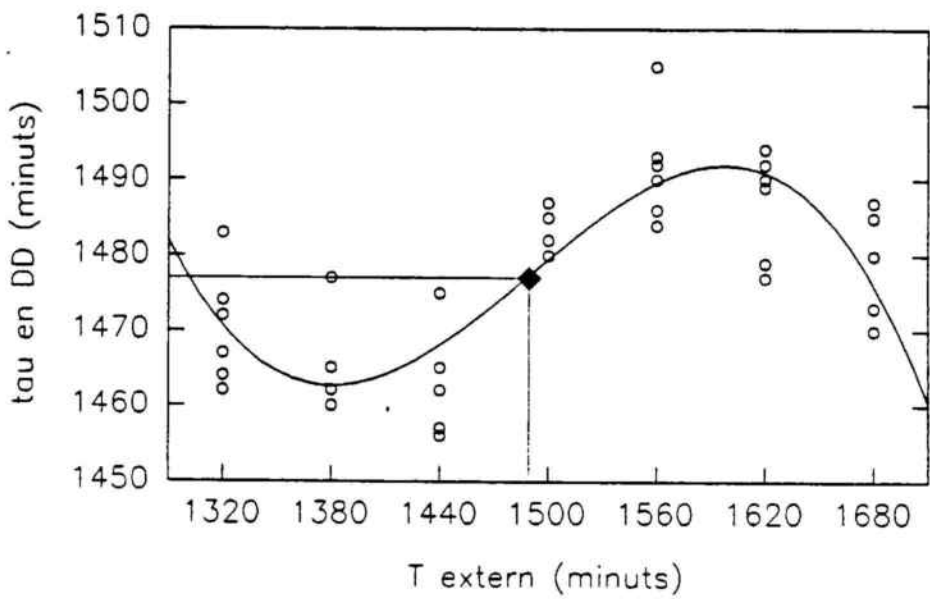


Figura 20. Relació entre el tau dels animals en curs lliure (FF) i el T previ. La corba correspon a un ajust polinòmic de tercer grau. El rombe negre correpon al punt d'inflexió i cal destacar que en aquest punt coincideix T_{τ} tau.

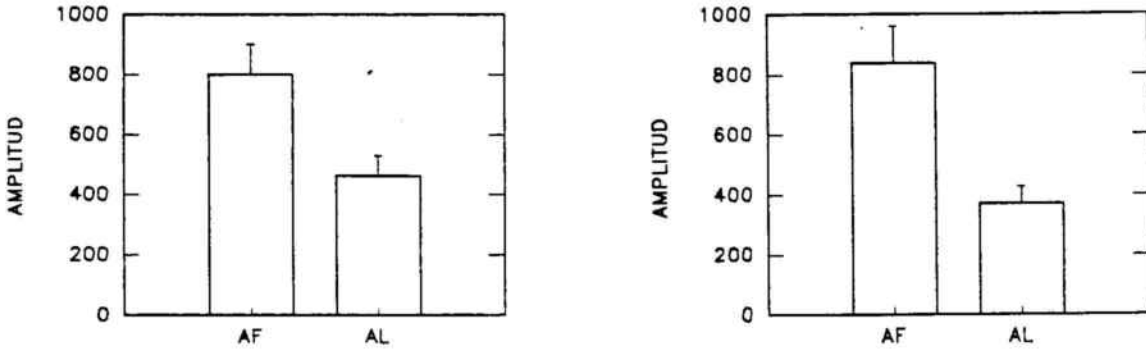


Figura 21. Mitjanes i error estàndar de l'amplitud de les oscil·lacions del nivell d'activitat durant les fases fosca (AF) i amb llum (AL) per als animals dels grups T22 i T23. Als dos grups hi ha diferències amb $p < 0.005$.

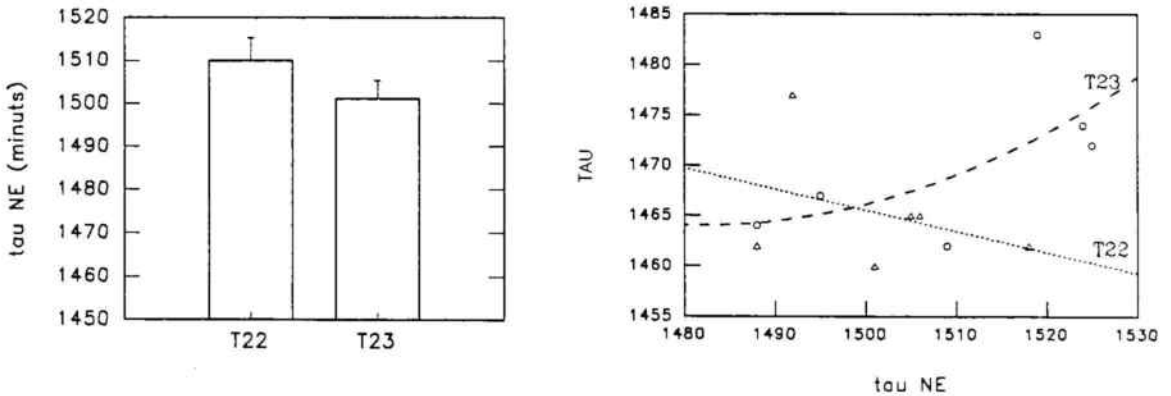


Figura 22. A) Mitjanes i errors estàndar dels períodes dels components no encarrilables per la llum en els animals dels grups T22 i T23. No s'han trobat diferències estadísticament significatives. B) Relació entre els períodes anteriors i el tau de cada animal en curs lliure (FF).

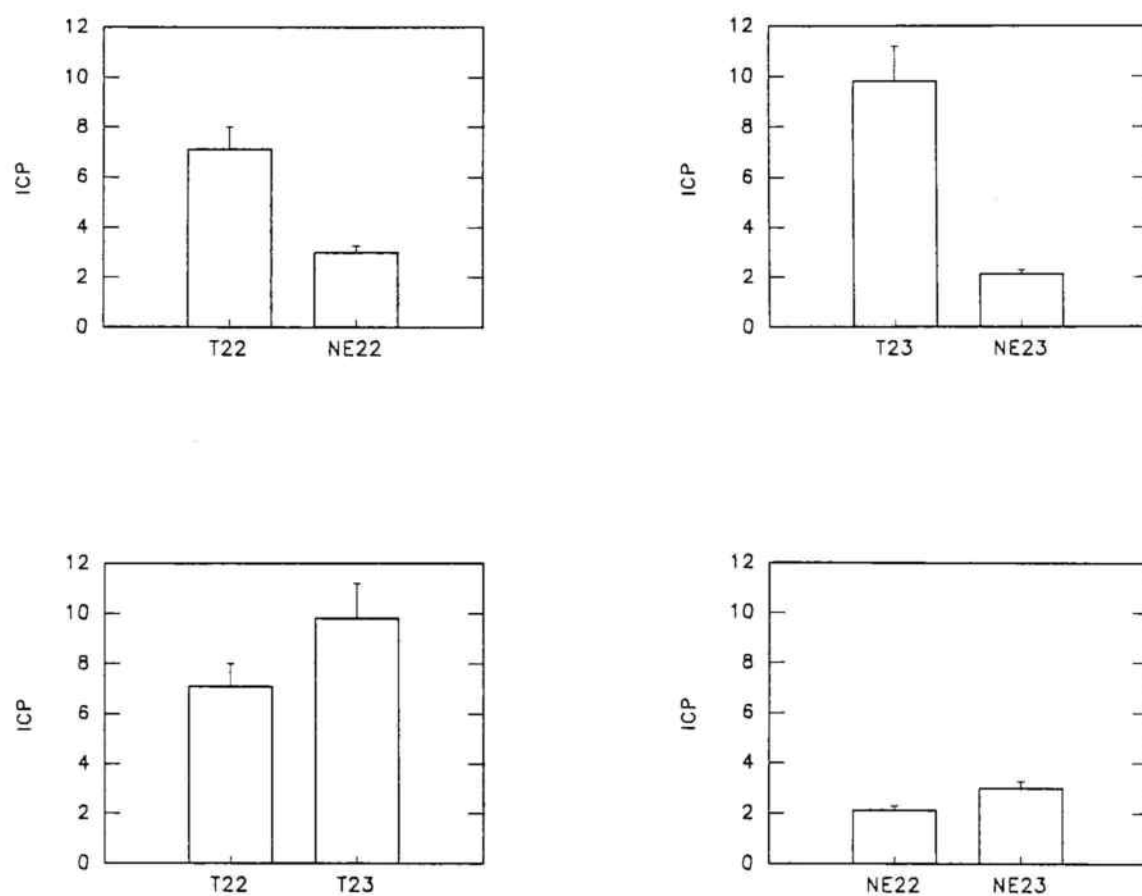


Figura 23. En A i B es comparen els períodes mitjans dels dos components (encarrilable i no encarrilable per la llum) de forma aparellada en els grups T22 i T23, trobant-se diferències significatives ($p < 0.05$) en els dos casos. En C i D es comparen els grups T22 i T23 per a cada component, trobant-se diferències tant sols en D (component no encarrilable).

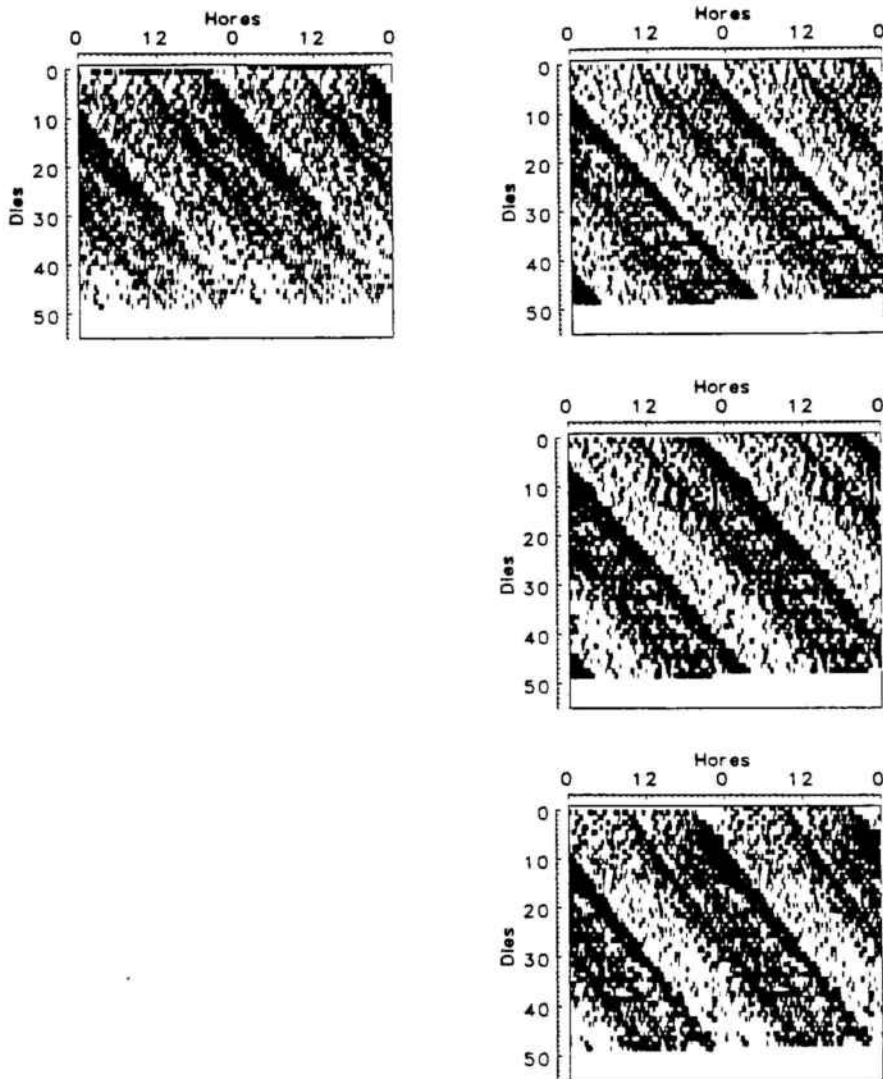


Figura 24. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota "fosc constant" (L0.25) equivalent a una dèbil llum vermella d'incandescència que produïa un nivell d'il·luminació menor de 0.025 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.

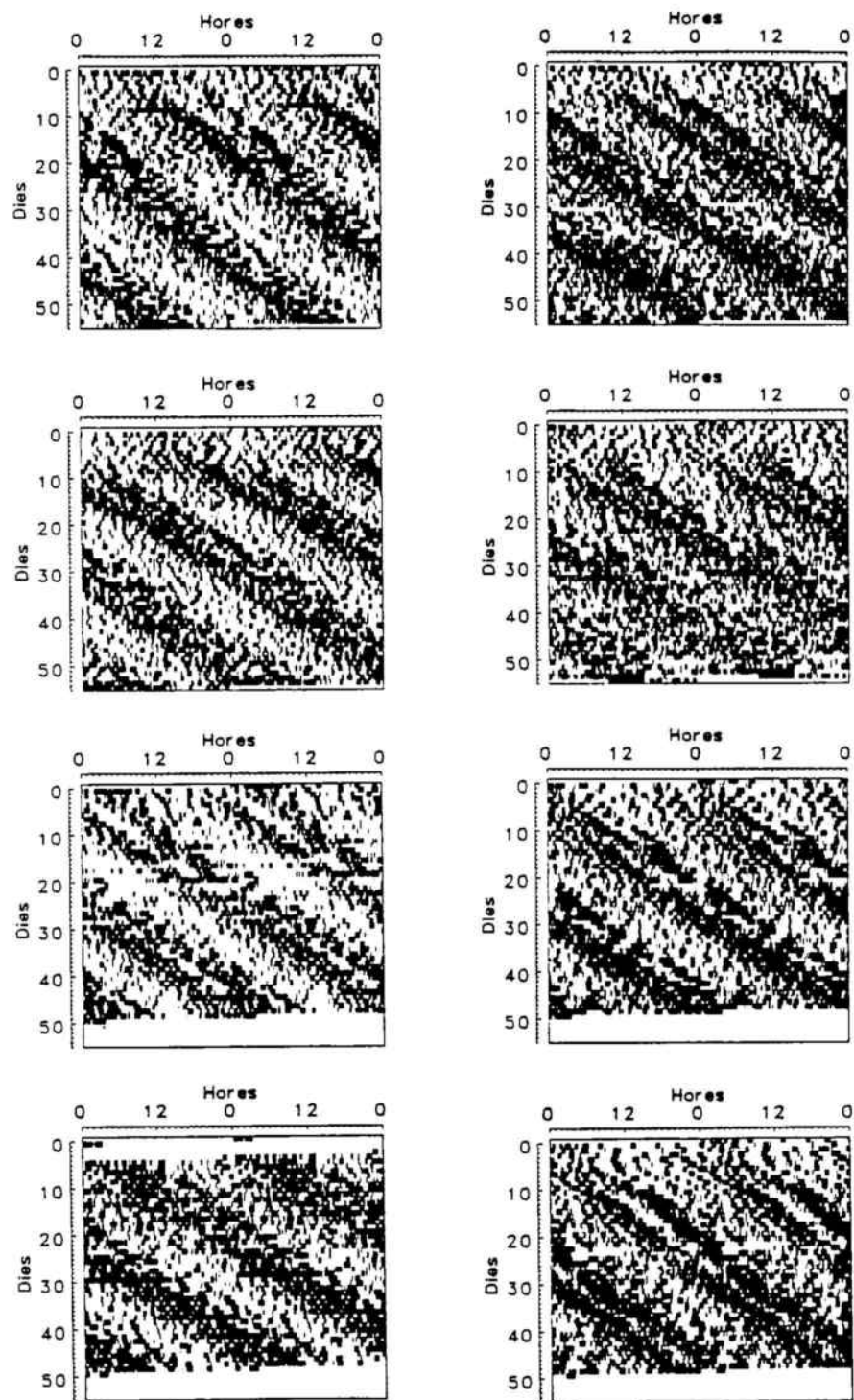


Figura 25. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L4) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produïen un nivell d'il·luminació de 4 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles. Per raons d'espai el cinquè mascle està representat a la figura següent.

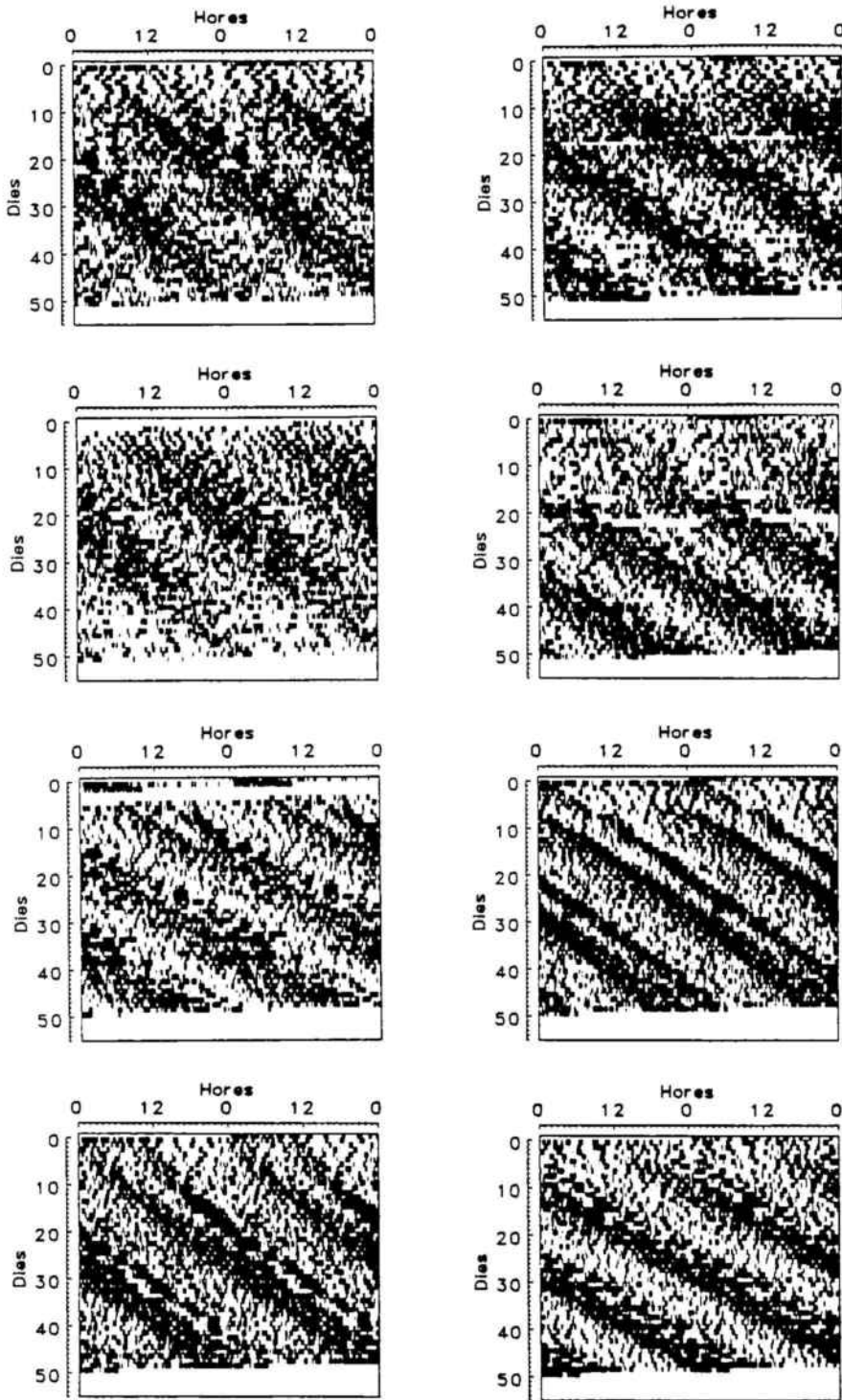


Figura 26. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L37) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produïen un nivell d'il·luminació de 37 lux. La columna de la dreta i l'inferior esquerra corresponen a les femelles. A l'esquerra es troben els mascles. Per raons d'espai el primer mascle és del grup L4.

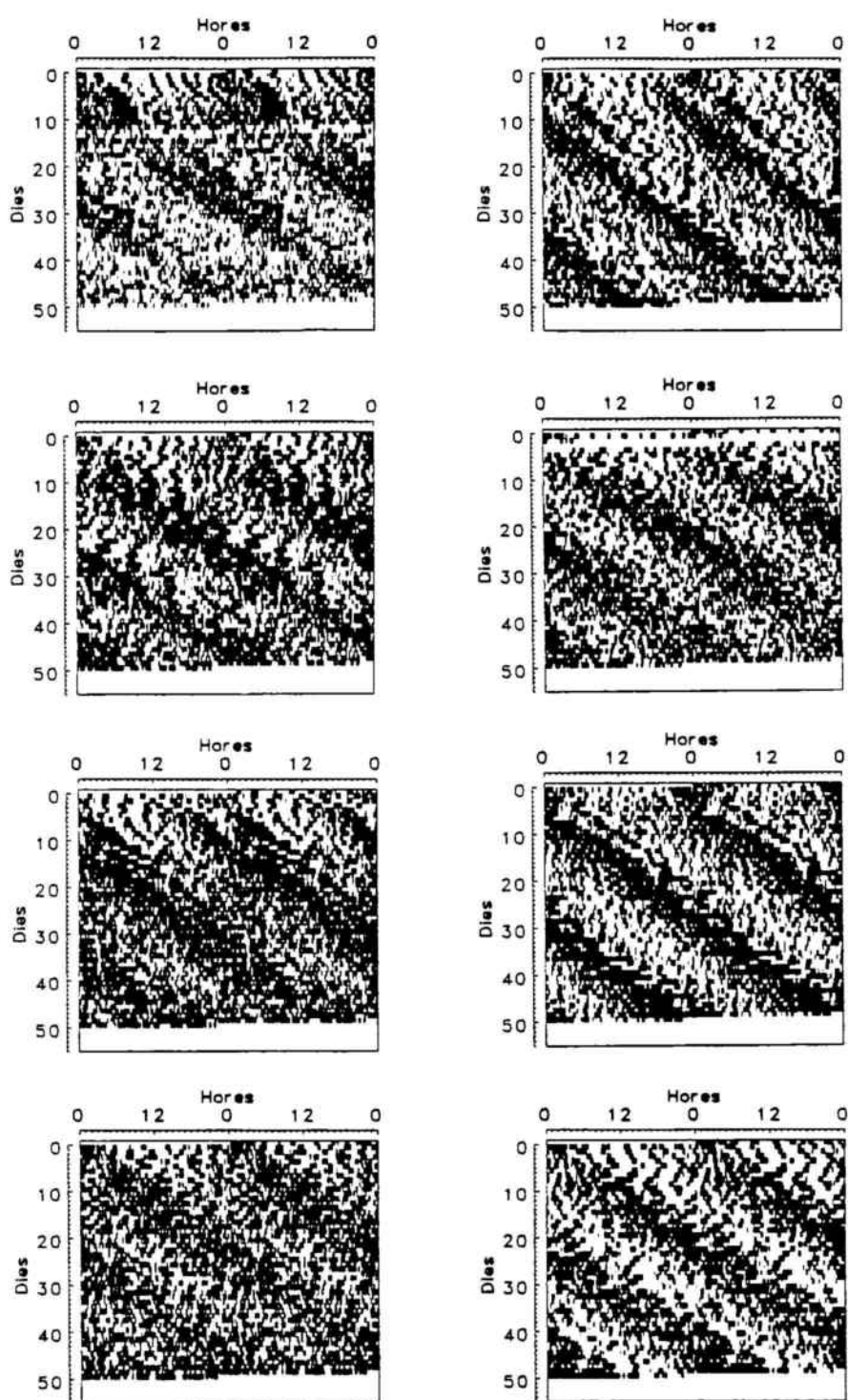


Figura 27. Dobles gràfiques dels animals mantinguts sota llum constant (L497) obtinguda amb fluorescents parcialment coberts que produeixen un nivell d'il·luminació de 497 lux. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.

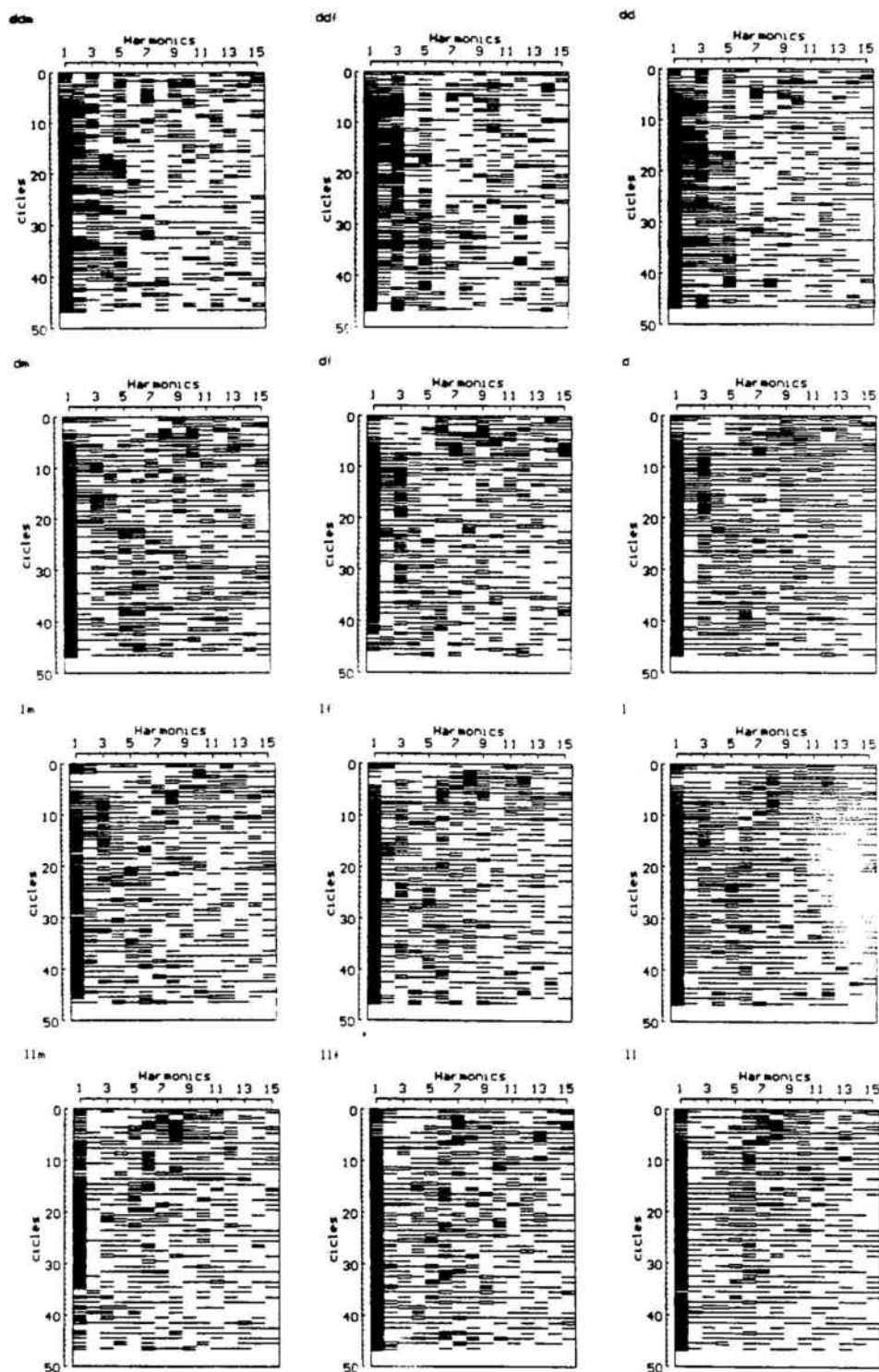


Figura 28. Matrius gràfiques mitjanes dels animals de cada condició d'il·luminació. Els espectres de potència han estat calculats en base al tau individual. Cada ratlla representa una potència del 2%. De dalt a baix les files corresponen als grups L0.25, L4, L37 i L497. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.

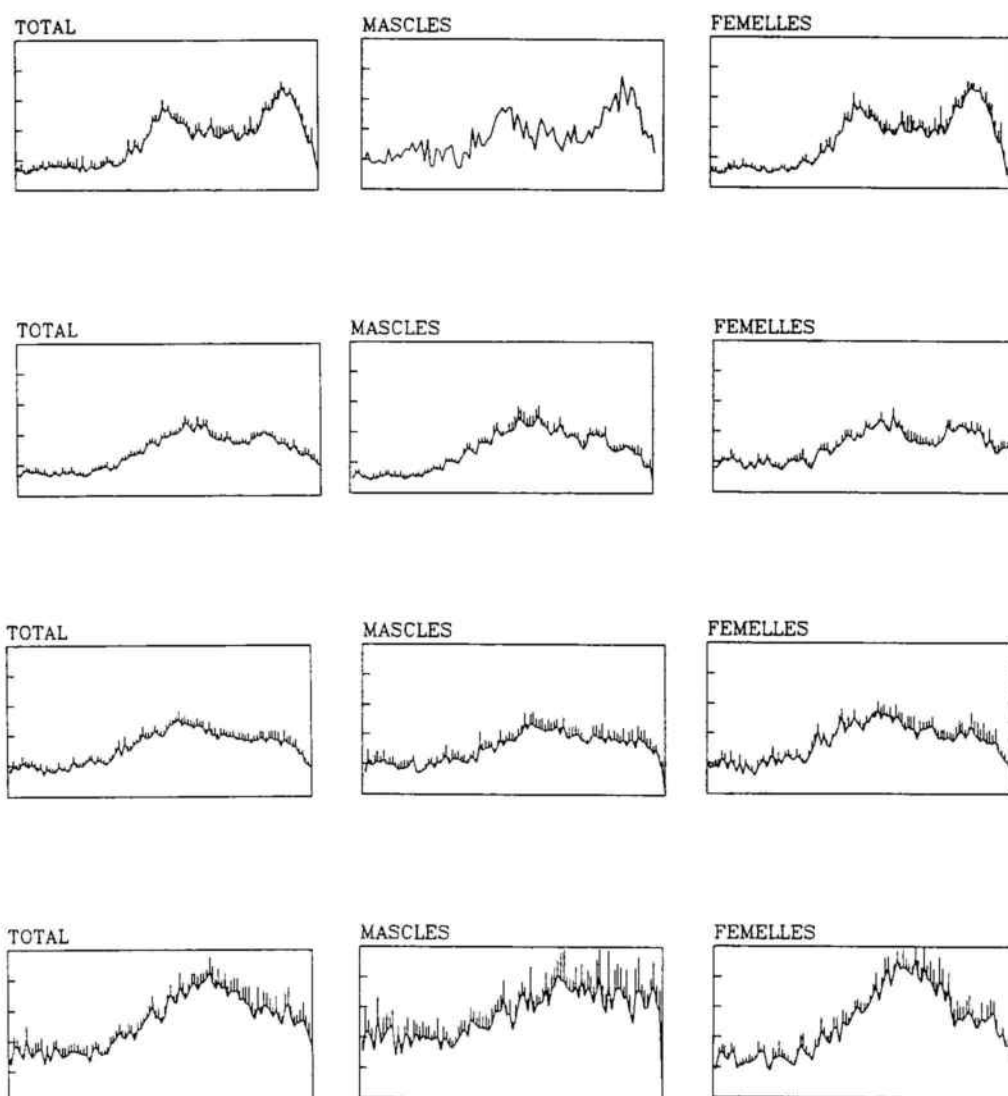


Figura 29. Formes d'ona mitjanes sota cada condició d'il.luminació calculades a partir de les formes mitjanes de cada animal. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries (les mateixes a totes les gràfiques) i el temps com a temps circadiari. De dalt a baix les files corresponen als grups L0.25, L4, L37 i L497.

TAU (minuts)				
GRUP		MASCLES	FEMELLES	TOTAL
0.25 lux	m	1475	1478.3	1477.5
	ds	---	4.04	3.67
	n	1	3	4
4 lux	m	1511.5	1509.2	1513
	ds	8.21	6.29	10.21
	n	4	4	8
37 lux	m	1503.3	1515.3	1509.3
	ds	12.47	7.63	11.52
	n	4	4	8
487 lux	m	1507.7	1506.0	1506.8
	ds	6.39	7.78	6.66
	n	4	4	8

Taula 2.

Anàlisi de la varianza del model linial pel TAU						
n. dades = 28		SQ. Total = 63398899		r = 0.9999		
n. var. = 3		SQ. Model = 63394843		s = 12.736		
g. l. = 25		SQ. Error = 4055.184		% V.E. = 99.99		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim. inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	6.0070	2.1835	2.7509	1.5098	10.5041	0.0108 *
Sexe	-1.1683	2.4314	-0.4805	-6.1761	3.8393	0.6350

Taula 3.

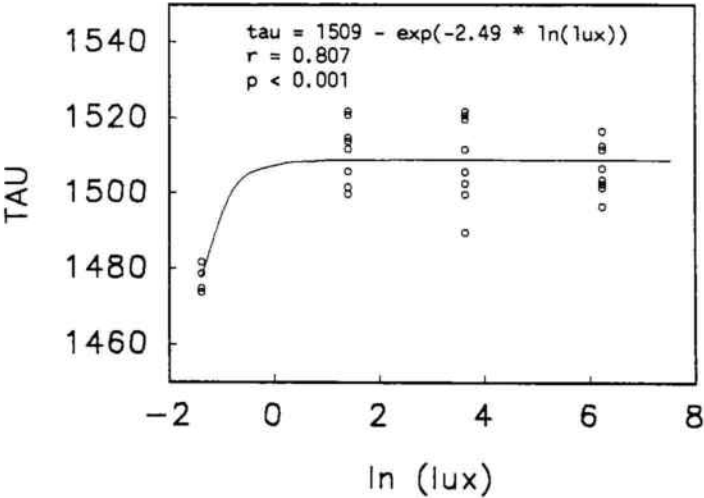


Figura 30. Representació gràfica de la relació entre el període endògen tau i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la corba exponencial de regressió (no linial).

SOROLL (%)				
GRUP		MASCLES	FEMELLES	TOTAL
0.25 lux	m	66.27	47.67	52.32
	ds		3.18	9.65
	n	1	3	4
4 lux	m	49.31	61.50	55.40
	ds	3.62	7.50	8.50
	n	4	4	8
37 lux	m	61.95	55.64	58.79
	ds	5.76	6.20	6.48
	n	4	4	8
487 lux	m	69.37	56.14	62.76
	ds	3.61	7.92	9.08
	n	4	4	8

Taula 4.

Anàlisi de la varianza del model linial pel SOROLL						
n. dades = 28		SQ. Total = 96331.73		r = 0.9919		
n. var. = 3		SQ. Model = 94786.98		s = 7.8606		
g. l. = 25		SQ. Error = 1544.751		% V.E. = 98.39		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	1.31	0.58	2.24	0.11	2.52	0.034 *
Sexe	-2.05	1.51	1.36	-5.14	1.03	0.185

Taula 5.

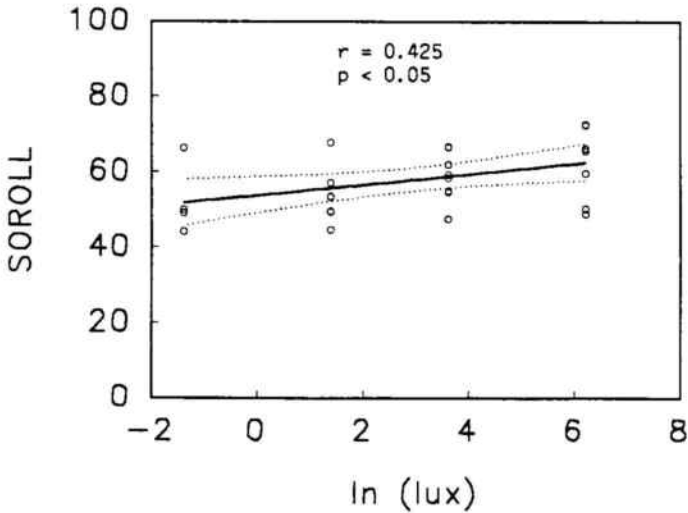


Figura 31. Representació gràfica de la relació entre el contingut de "soroll" present en els patrons d'activitat motora i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).

Taula 6.

IA/D				
GRUP		MASCLES	FEMELLES	TOTAL
0.25 lux	m ds n	0.25 1	0.4815 0.3061 3	0.4244 0.1169 4
4 lux	m ds n	0.4565 0.0741 4	0.2966 0.1064 4	0.3765 0.1205 8
37 lux	m ds n	0.2978 0.0776 4	0.3399 0.034 4	0.3189 0.059 8
487 lux	m ds n	0.2021 0.0462 4	0.3545 0.0672 4	0.2783 0.0973 8

Anàlisi de la varianza del model linial pel IA/D						
n. dades = 28		SQ. Total = 3.5229		r = 0.9672		
n. var. = 3		SQ. Model = 3.2961		s = 0.0952		
g. l. = 25		SQ. Error = 0.2267		% V.E. = 93.56		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	P
Ln (lux)	-0.0190	0.0071	-2.6845	-0.0336	-0044	0.0128 *
Sexe	-0.0174	0.0181	-0.9564	-0.0548	0.0201	0.348

Taula 7.

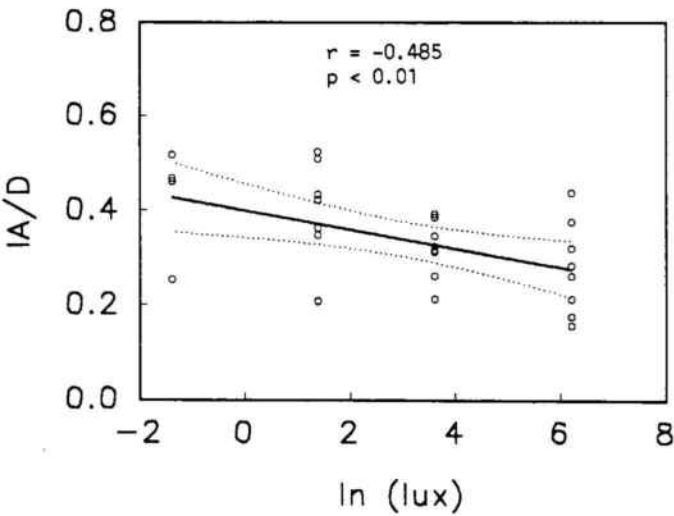


Figura 32. Representació gràfica de la relació entre l'index d'activació/desactivació (IA/D) i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).

Taula 8.

ICP				
GRUP		MASCLES	FEMELLES	TOTAL
0.25 lux	m	8.00	16.99	14.74
	ds		1.95	4.77
	n	1	3	4
4 lux	m	10.22	6.28	8.25
	ds	0.78	2.61	2.76
	n	4	4	8
37 lux	m	5.78	8.42	7.11
	ds	2.05	2.13	2.40
	n	4	4	8
487 lux	m	3.79	8.65	6.22
	ds	0.79	2.64	3.16
	n	4	4	8

Anàlisi de la varianza del model linial pel ICP						
n. dades = 28		SQ. Total = 2360.69		r = 0.9466		
n. var. = 3		SQ. Model = 2115.75		s = 3.1306		
g. l. = 25		SQ. Error = 244.94		% V.E. = 89.62		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	-0.8803	0.2331	-3.7771	-1.3603	-0.4003	0.0009 *
Sexe	-1.1836	0.5975	-1.9808	-2.4144	0.0471	0.0588

Taula 9.

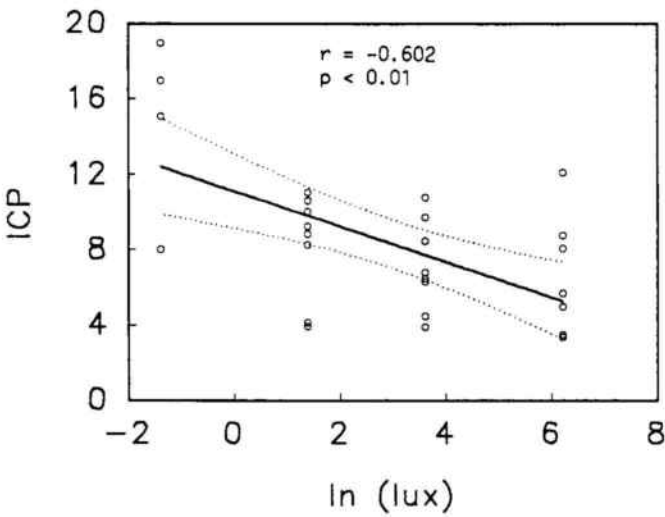


Figura 33. Representació gràfica de la relació entre l'índex de constància del patró d'activitat motora i el logaritme del nivell d'il.luminació. Es representen els valors individuals i la recta regressió (amb límits fiducials).

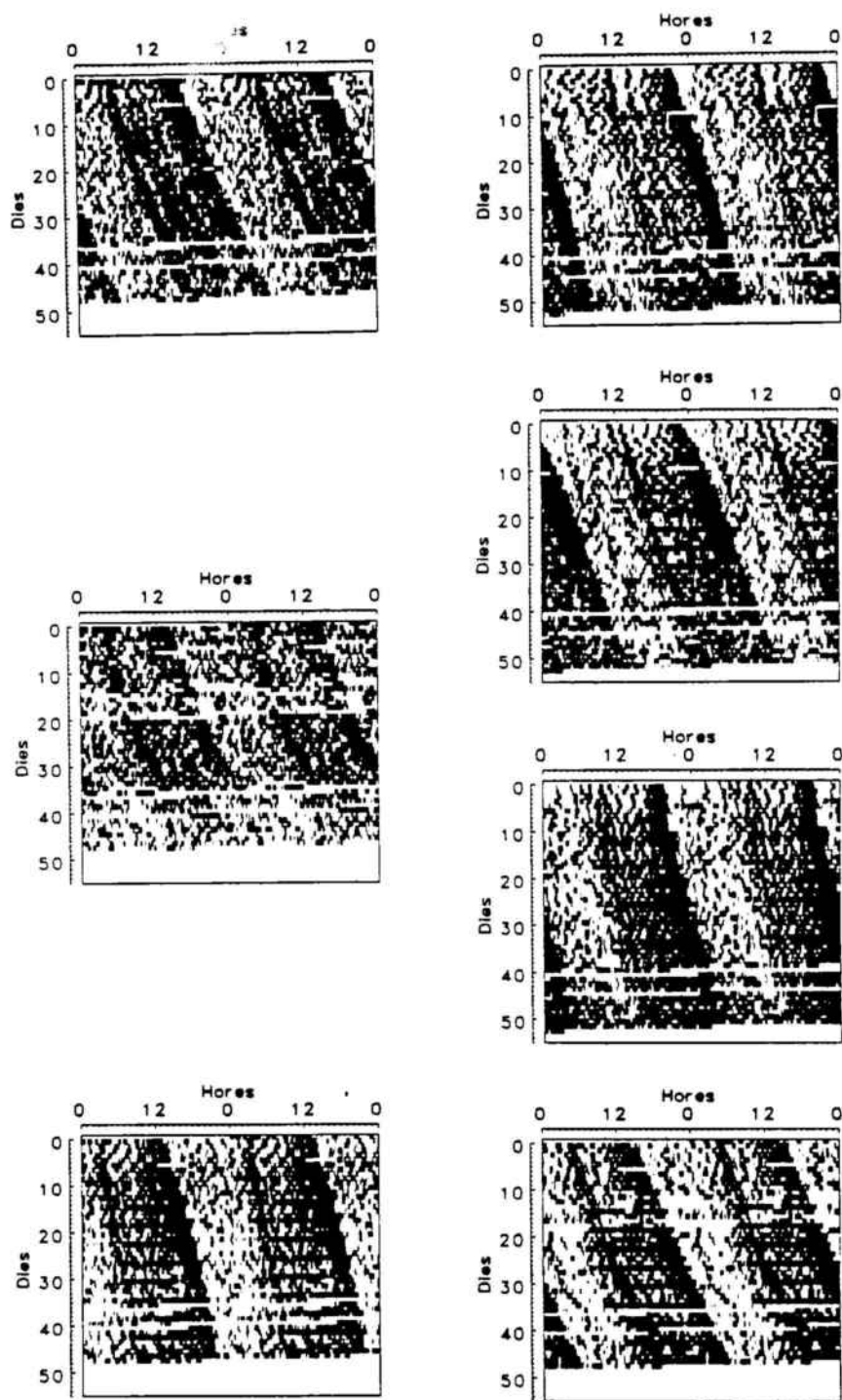


Figura 35. Dobles gràfiques dels animals pinealectomitzats mantinguts sota "fosc constant" (llum vermella <0.025 lux). La columna de la dreta i l'inferior esquerra corresponen a les femelles. A l'esquerra es troben els mascles. Per raons d'espai el primer mascle és del grup L4.

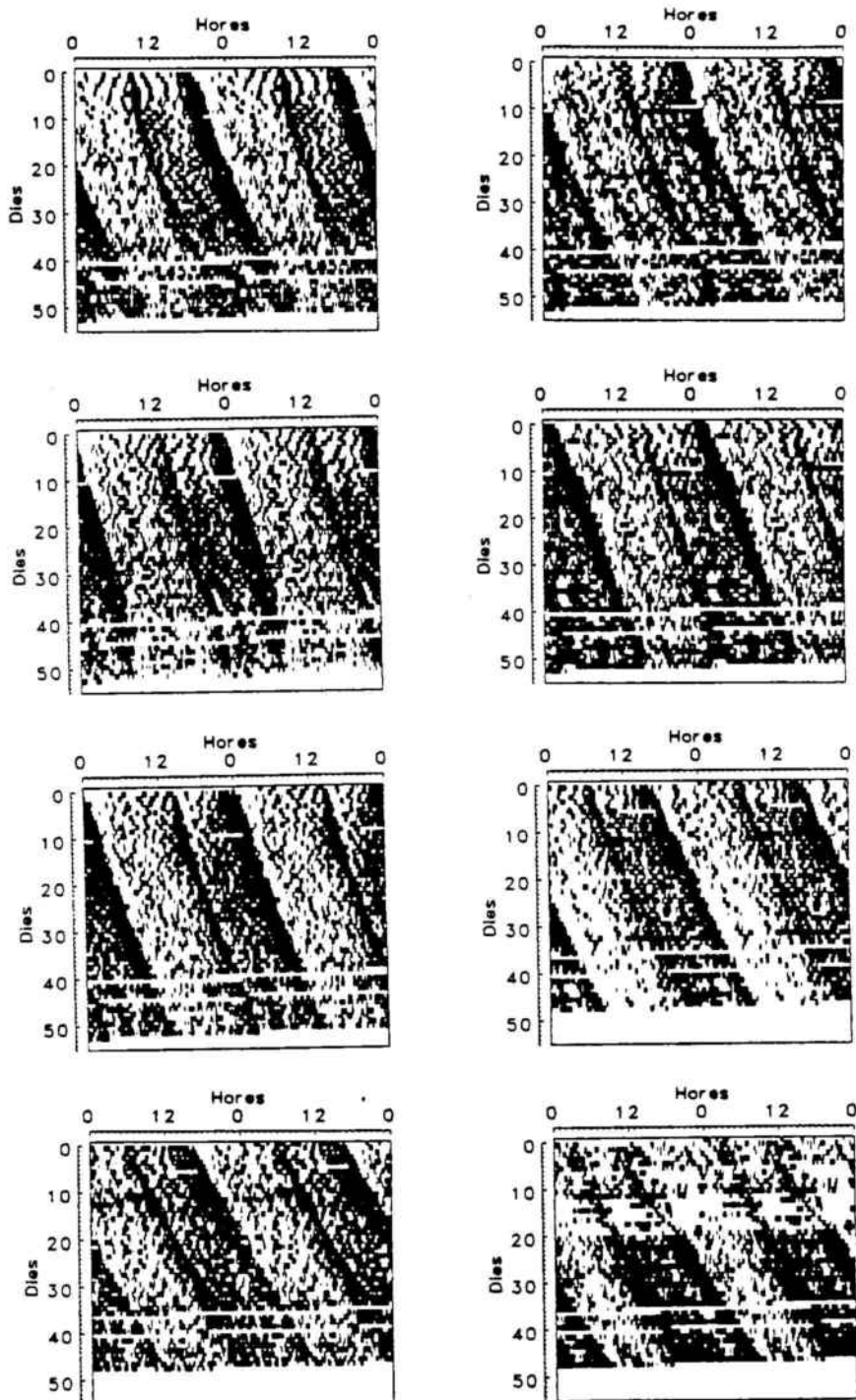


Figura 34. Dobles gràfiques dels animals *Sham* mantinguts sota "fosc constant" (llum vermella < 0.025 lux). La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles. Per raons d'espai el cinquè mascle està representat a la figura següent.

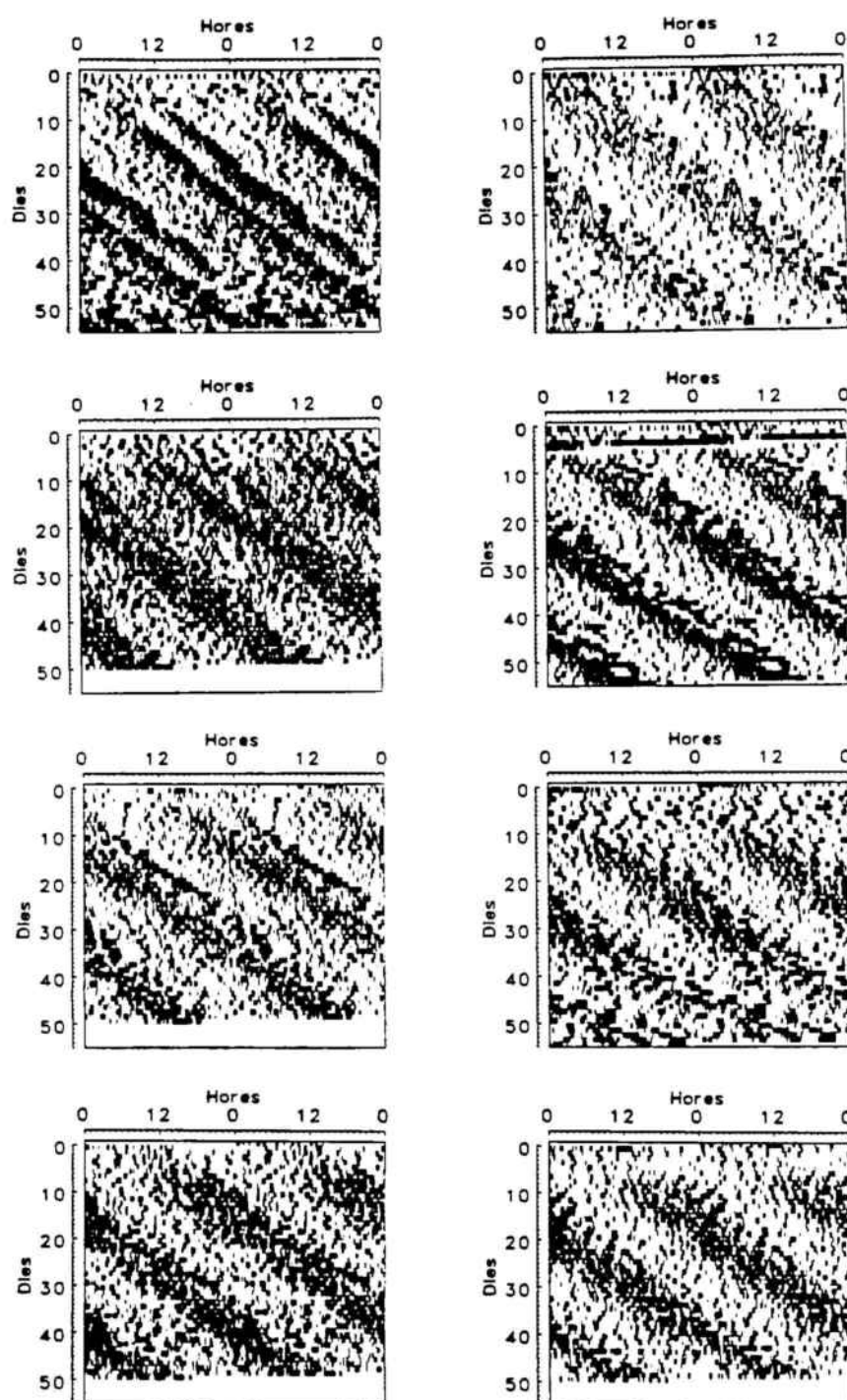


Figura 36. Dobles gràfiques dels animals *Sham* mantinguts sota llum constant. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.

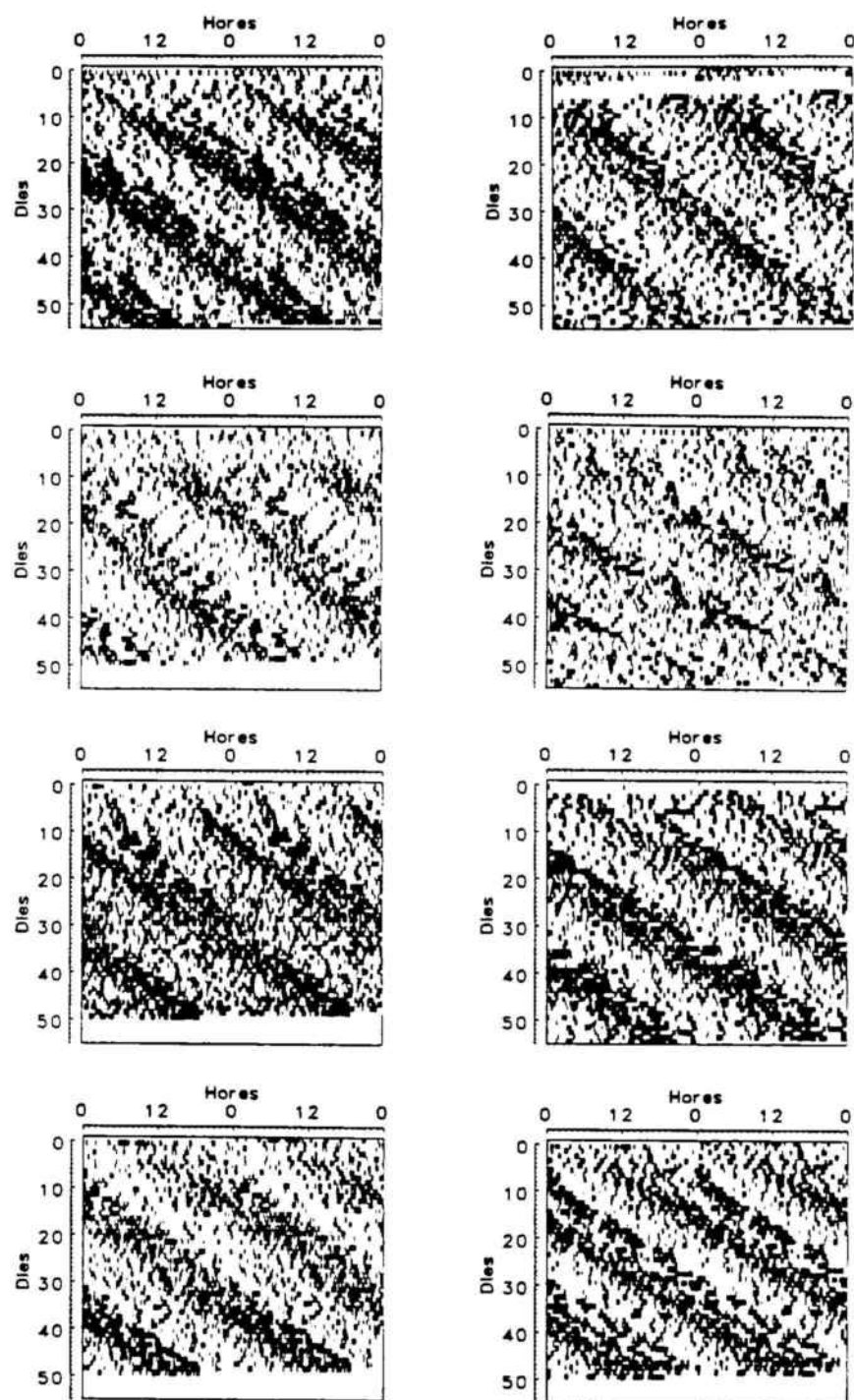


Figura 37. Dobles gràfiques dels animals pinealectomitzats mantinguts sota llum constant. La columna de l'esquerra correspon als mascles i la de la dreta a les femelles.

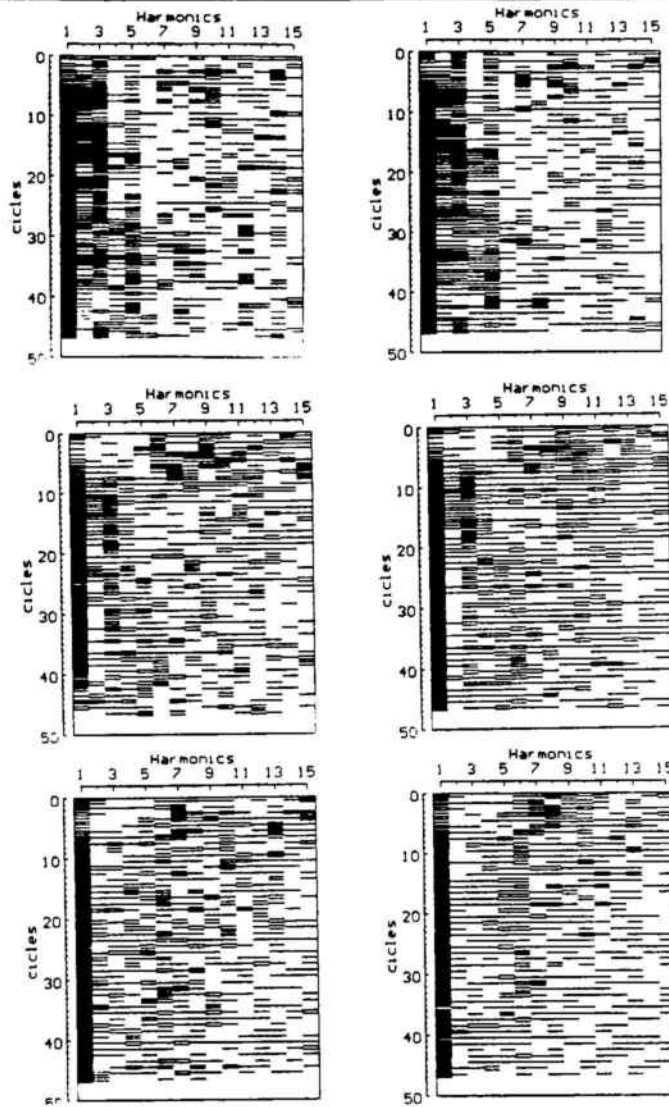


Figura 38. Matrius gràfiques mitjanes de cada situació experimental. Els espectres de potència s'han calculat en base al tau individual. Cada ratlla representa un 2% de potència. De dalt a baix corresponen als grups FF-Sham, FF-Px, LL-Sham i LL-Px. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.

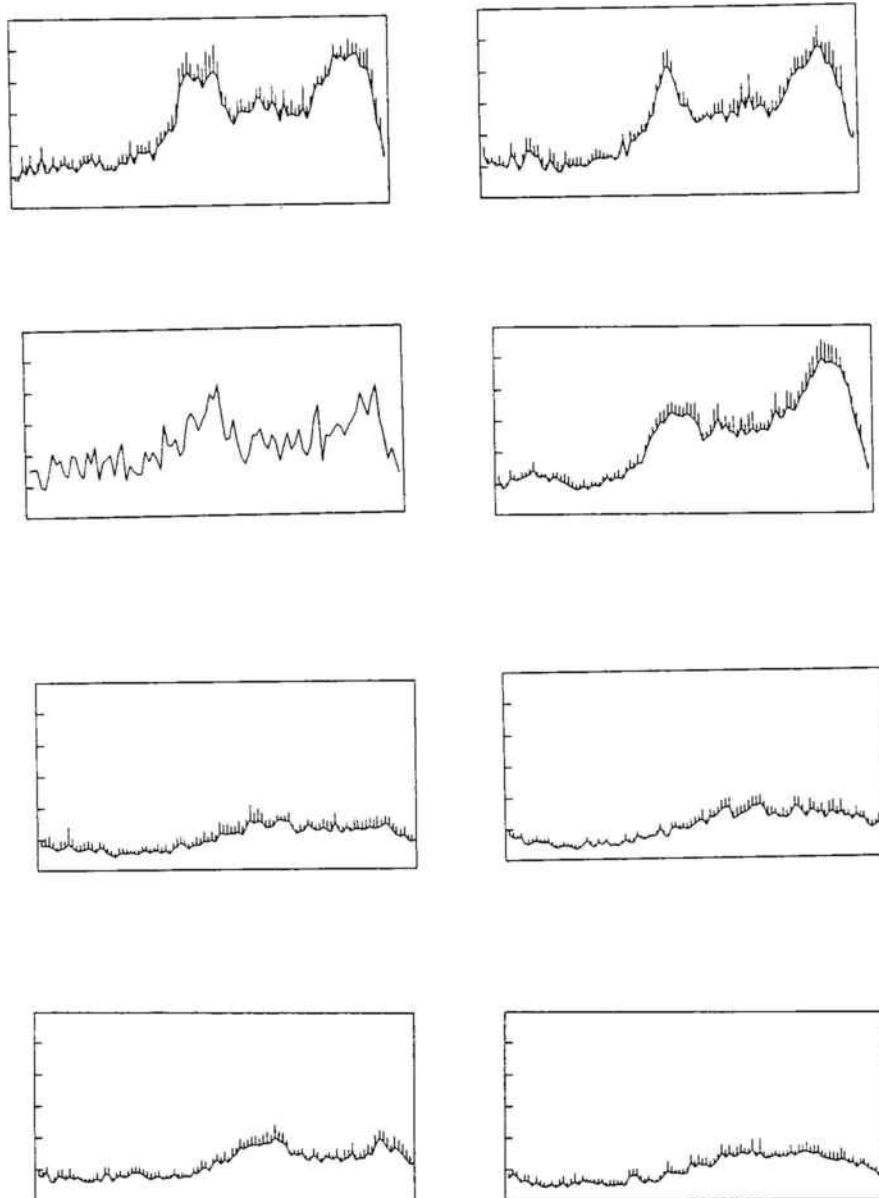


Figura 39. Formes d'ona mitjanes per a cada situació experimental calculades a partir de les mitjanes individuals. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries respecte el temps circadiari. De dalt a baix corresponen als grups FF-*Sham*, FF-Px, LL-*Sham*, LL-Px. Per columnes d'esquerra a dreta: mascles femelles i ambdós sexes.

		TAU		
		MASCLES	FEMELLES	
DD	PX	m 1461.0 ds --- n 1	m 1454.4 ds 3.91 n 5	m 1457.4 ds 4.40 n 15
	SHAM	m 1457.2 ds 4.47 n 5	m 1960.5 ds 3.41 n 4	
LL	PX	m 1501.7 ds 3.49 n 4	m 1508.2 ds 7.67 n 4	m 1506.3 ds 8.33 n 16
	SHAM	m 1503.5 ds 3.51 n 4	m 1511.7 ds 13.4 n 4	

Taula 10. Valors mitjans de tau per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.

Anàlisi de la varianza del model linial pel TAU						
n. dades = 31		SQ. Total = 68165172		r = 0.99999		
n. var. = 4		SQ. Model = 68164052		s = 6.439453		
g. l. = 27		SQ. Error = 1119.59		% V.E. = 99.99		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim. inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	6.5438	0.3085	21.2115	5.9108	7.1768	0.00000 *
Sexe	-2.1066	1.1882	-1.7728	-4.5447	0.3315	0.0878
Px	-1.8288	1.1882	-1.5391	-4.2669	0.6092	1.354

Taula 11. Anàlisi de la varianza dels valors tau.

		SOROLL		
		MASCLES	FEMELLES	
DD	PX	m 62.62 ds --- n 1	m 47.14 ds 3.49 n 5	m 49.70 ds 5.99 n 15
	SHAM	m 52.88 ds 5.34 n 5	m 45.7 ds 1.83 n 4	
LL	PX	m 55.88 ds 6.13 n 4	m 52.08 ds 5.04 n 4	m 53.71 ds 5.66 n 16
	SHAM	m 55.22 ds 8.35 n 4	m 51.67 ds 3.02 n 4	

Taula 12. Valors mitjans del contingut de "soroll" per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.

Anàlisi de la varianza del model linial pel SOROLL						
n. dades = 31		SQ. Total = 842P3.79		r = 0.9957		
n. var. = 4		SQ. Model = 83483.53		s = 5.1649		
g. l. = 27		SQ. Error = 720.26		% V.E. = 99.144		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	0.4306	0.2474	1.7403	-0.0771	0.9383	0.093
Sexe	2.992	0.9531	3.1394	1.0365	4.9475	0.0040 *
Px	0.7001	0.9531	0.7346	-1.2554	2.6556	0.4688

Taula 13. Anàlisi de la varianza dels valors del contingut de "soroll".

		IA/D		
		MASCLES	FEMELLES	
DD	PX	m 0.098 ds --- n 1	m 0.428 ds 0.08 n 5	m 0.37 ds 0.13 n 15
	SHAM	m 0.36 ds 0.18 n 5	m 0.39 ds 0.04 n 4	
LL	PX	m 0.19 ds 0.18 n 4	m 0.27 ds 0.19 n 4	m 0.21 ds 0.14 n 16
	SHAM	m 0.13 ds 0.1 n 4	m 0.25 ds 0.06 n 4	

Taula 14. Valors mitjans de l'índex d'activació/desactivació (IA/D) per a cada condició experimental i per a cada condició d'il·luminació.

Anàlisi de la varianza del model linial pel IA/D						
n. dades = 31		SQ. Total = 3.3788		r = 0.92391		
n. var. = 4		SQ. Model = 2.8842		s = 0.13534		
g. l. = 27		SQ. Error = 0.4946		% V.E. = 85.362		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim. inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	-0.0197	0.0065	-3.0391	-0.0330	-0.0064	0.0052 *
Sexe	-0.0497	0.0249	-1.9915	-0.1010	0.0015	0.0566
Px	0.0014	0.0249	0.0587	-0.0497	0.0527	0.954

Taula 15. Anàlisi de la variança dels valors de l'índex d'activació/desactivació (IA/D) .

		ICP		
		MASCLES	FEMELLES	
DD	PX	m 3.02 ds --- n 1	m 12.48 ds 1.76 n 5	m 10.99 ds 3.51 n 15
	SHAM	m 10.0 ds 2.78 n 5	m 12.36 ds 3.73 n 4	
LL	PX	m 7.02 ds 1.35 n 4	m 7.09 ds 2.51 n 4	m 7.38 ds 1.77 n 16
	SHAM	m 7.8 ds 1.86 n 4	m 7.61 ds 1.90 n 4	

Taula 16. Valors mitjans de l'índex de constància del patró per a cada condició experimental i per a cada condició d'il.luminació.

Anàlisi de la varianza del model linial pel ICP						
n. dades = 31		SQ. Total = 2905.953		r = 0.96594		
n. var. = 4		SQ. Model = 2711.367		s = 2.68456		
g. l. = 27		SQ. Error = 194.586		% V.E. = 93.30		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim. inf.	lim. sup.	p
Ln (lux)	-0.4419	0.1286	-3.4361	-0.7058	-0.1780	0.0018 *
Sexe	-0.9024	0.4954	-1.8217	-1.9188	0.1139	0.0794
Px	-0.3735	0.4954	-0.7540	-1.3899	0.6428	0.4572

Taula 17. Anàlisi de la varianza dels valors de l'índex de constància del patró.

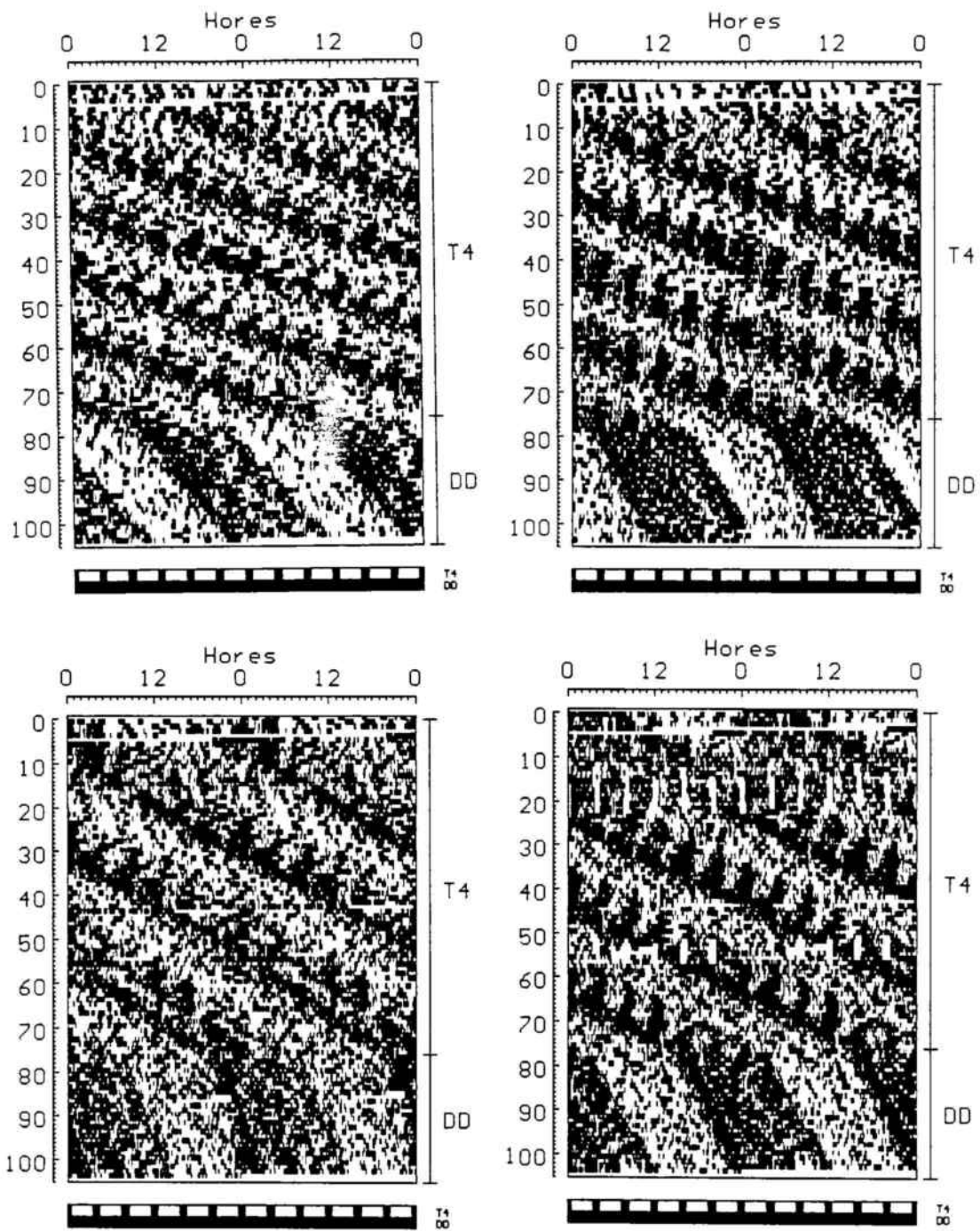


Figura 40. Dobles gràfiques dels mascles *Sham* mantinguts sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.

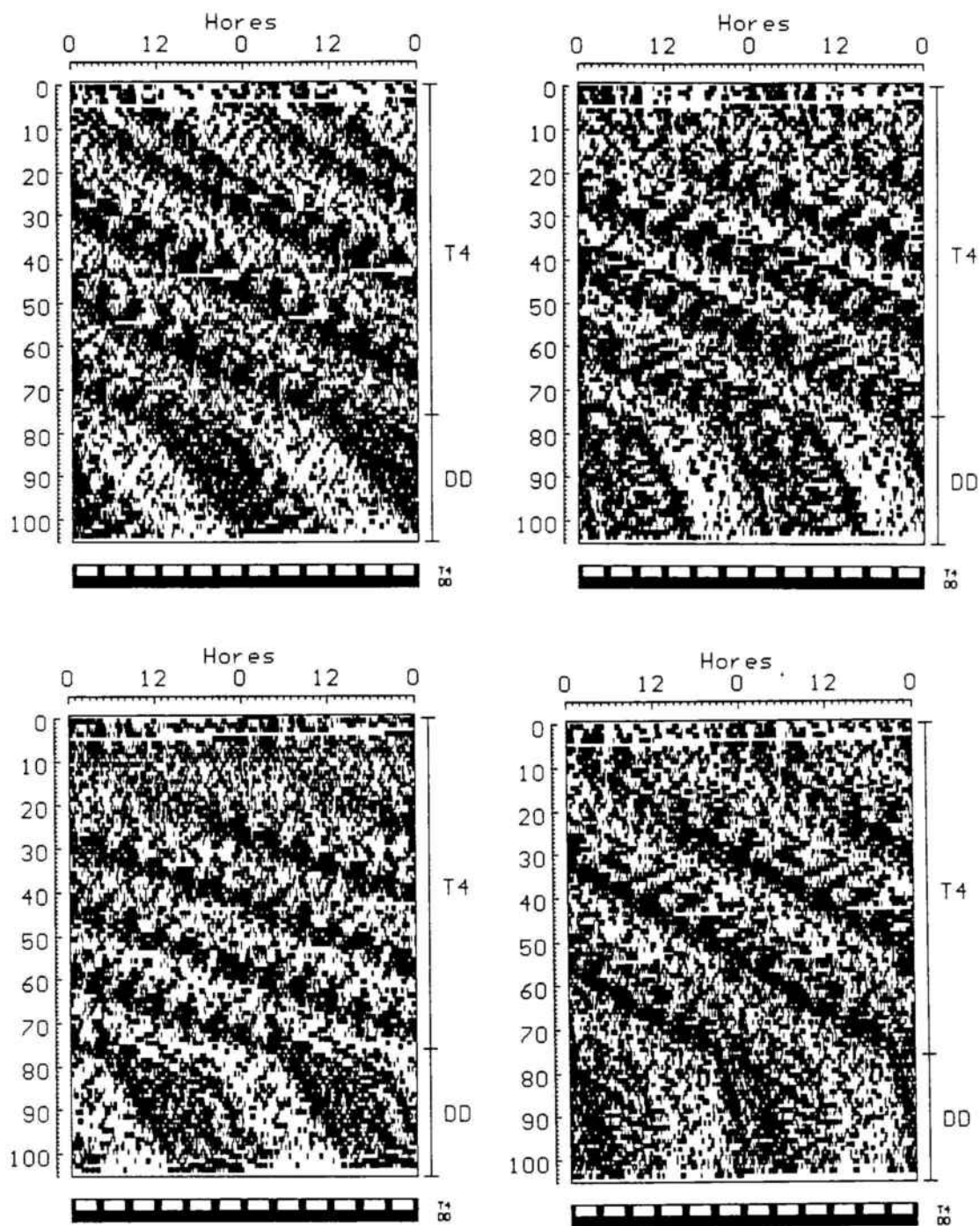


Figura 41. Dobles gràfiques dels mascles pinealectomitzats mantinguts sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.

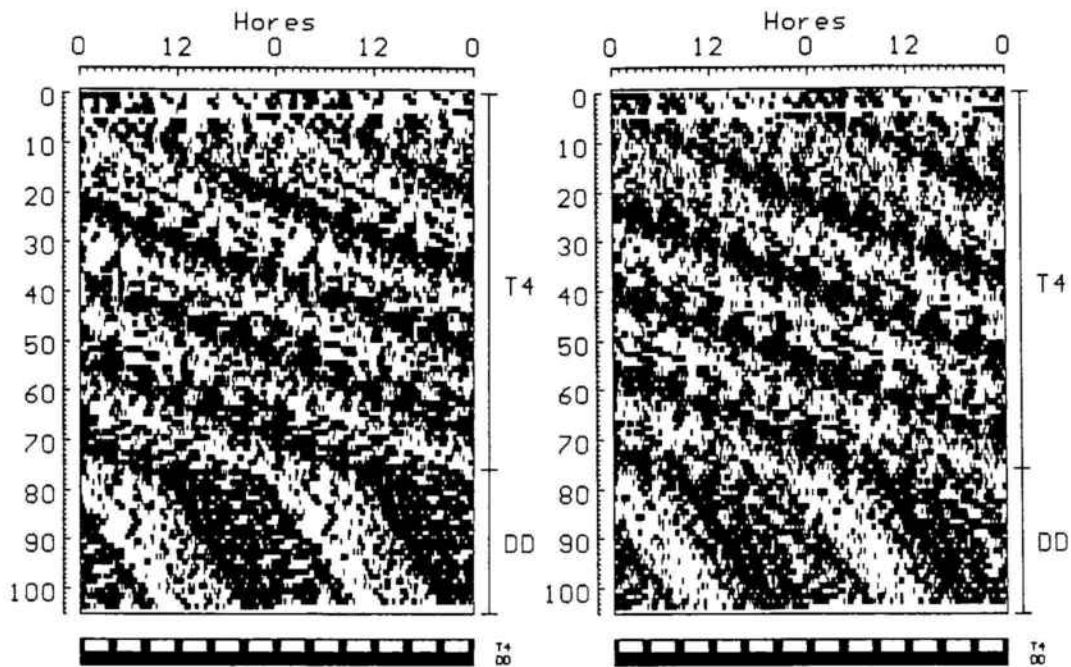


Figura 42. Dobles gràfiques de les femelles *Sham* mantingudes sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.

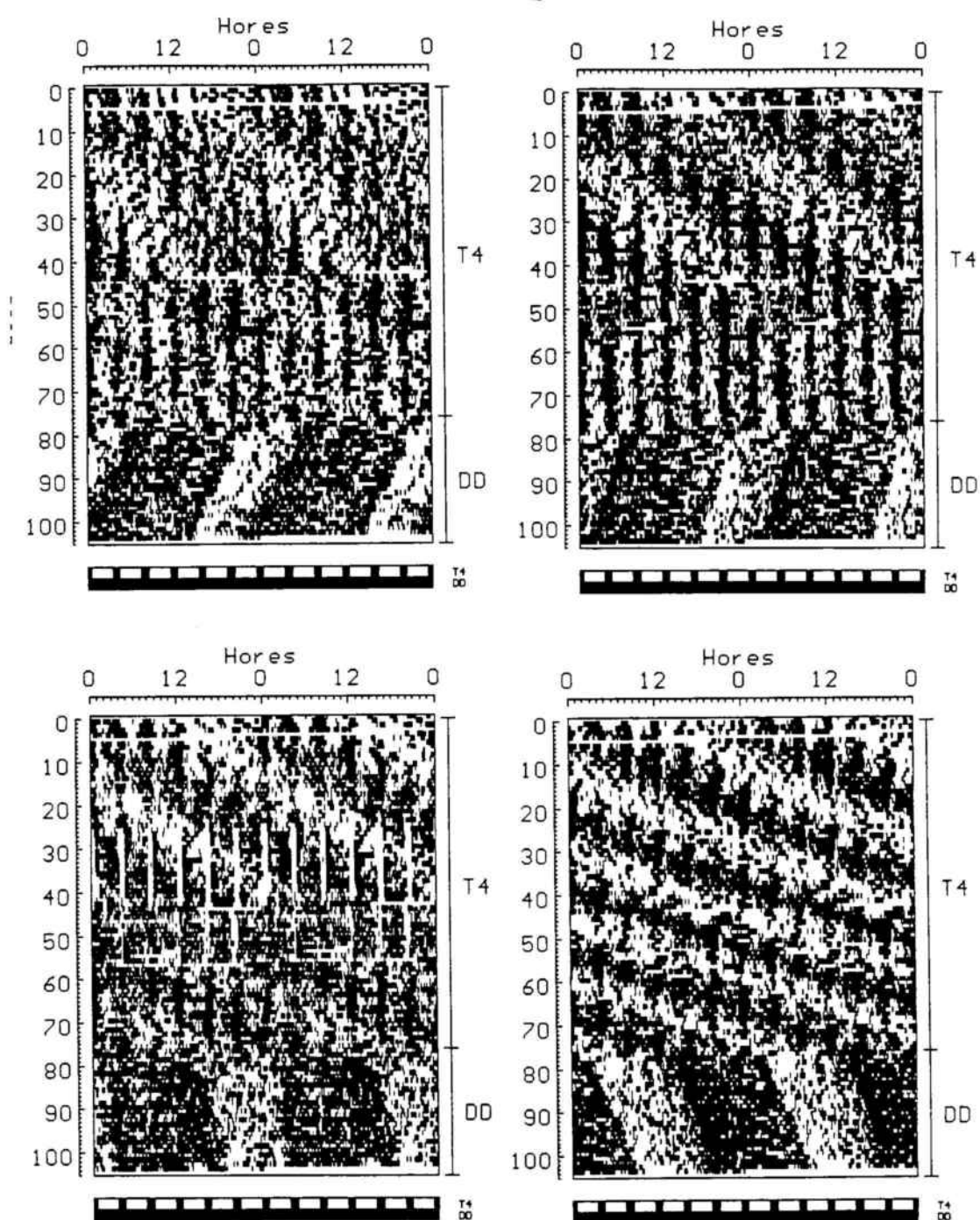


Figura 43. Dobles gràfiques de les femelles pinealectomitzades mantingudes sota cicles LF amb 4 hores de període. El primer dia correspon al deslletament.

TAU (durant T4)		
	SHAM	PX
MASCLES	m 1515.8 ds 14.18 n 5	m -1514.66 ds 9.45 n 3
FEMELLES	m 1523.5 ds 2.12 n 2	m 1497.25 ds 17.48 n 4

Taula 18. Valors mitjans del tau observat sota cicles LF de 4 hores.

Anàlisi de la varianza del model linial pel TAU (durant T4)						
n. dades = 14		SQ. Total = 31981933		r = 0.99		
n. var. = 3		SQ. Model = 31979536		s = 14.76		
g. l. = 11		SQ. Error = 2396.285		% V.E. = 99.99		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim. inf.	lim. sup.	p
sexe	3	4.1627	378.7521	-6.1621	12.1621	0.486
Px	-5.7857	4.1200	-1.4042	-14.8538	3.2824	0.186

Taula 19. Anàlisi de la varianza dels valors de tau sota cicles LF de 4 hores.

TAU (FF)		
	SHAM	PX
MASCLES	m 1461. ds 7.35 n 5	m 1453 ds 8.54 n 3
FEMELLES	m 1464 ds 2.83 n 2	m 1437.7 ds 13.84 n 4

Taula 20. Valors mitjans del tau en curs lliure (FF) després d'estar sota cicles LF de 4 hores.

Anàlisi de la varianza del model linial pel TAU (FF)						
n. dades = 14		SQ. Total = 29562269		r = 0.99		
n. var. = 3		SQ. Model = 29561064		s = 10.46		
g. l. = 11		SQ. Error = 1204.279		% V.E. = 99.99		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
sexe	3.4772	2.9510	1.1783	-3.0178	9.9724	0.262
Px	-7.7922	2.9207	-2.6678	-14.2207	-1.3636	0.0218 *

Taula 21. Anàlisi de la varianza dels valors de tau en curs lliure (FF) després d'estar sota cicles LF de 4 hores.

DIFERENCIA DE TAU (FF-T4)		
	SHAM	PX
MASCLES	m -54.8 ds 12.07 n 5	m -61.66 ds 3.78 n 3
FEMELLES	m -59.5 ds 4.95 n 2	m -59.50 ds 7.72 n 4

Taula 22. Valors mitjans de les diferències de tau sota cicles LF de 4 hores i en curs lliure (FF).

Anàlisi de la varianza del model linial per L'INCREMENT DE TAU						
n. dades = 14		SQ. Total = 29562269		r = 0.99		
n. var. = 3		SQ. Model = 29561064		s = 10.46		
g. l. = 11		SQ. Error = 1204.279		% V.E. = 99.99		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	-58.3538	2.3782	-24.5360	-63.5884	-53.1193	0.000001 *
sexe	0.4772	2.4817	0.1923	-4.9849	5.9395	0.460
Px	-2.006	2.4562	-0.8169	-7.4127	3.3997	0.430

Taula 23. Anàlisi de la varianza de les diferències de tau sota cicles LF de 4 hores i en curs lliure (FF).

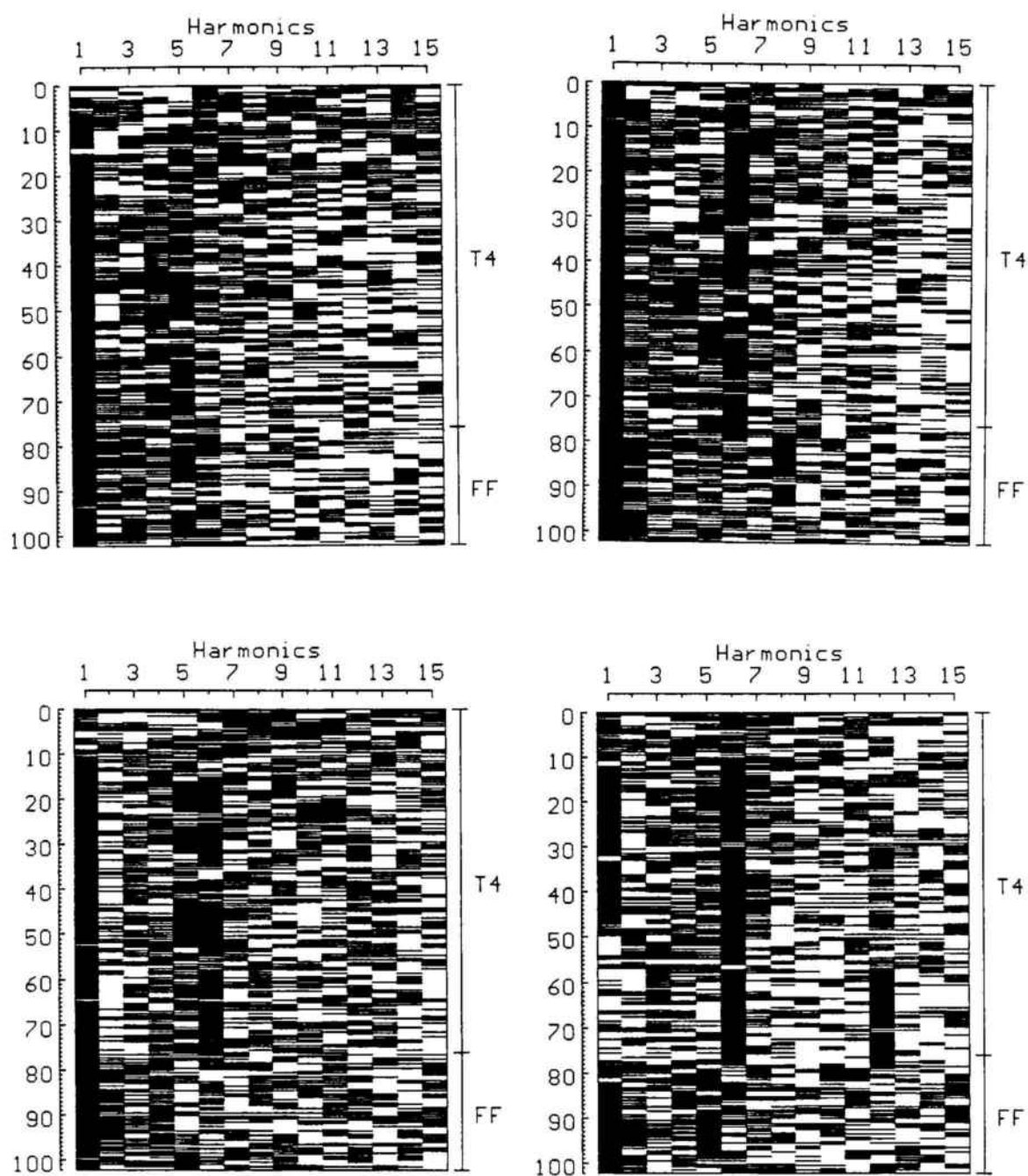


Figura 44. Matrius gràfiques mitjanes dels animals agrupats per sexe i tipus de manipulació. Els espectres de potència han estat calculats en base a 24 hores. Cada ratlla representa una potència del 2%. La fila de dalt correspon a animals *Sham* i la de baix als pinealectomitats. Els mascles són a la dreta i a l'esquerra les femelles.

CP H6-H12		
	MASCLES	FEMELLES
SHAM	m 4.455 ee 0.506 n 5	m 5.760 ee 0.027 n 2
PX	4.127 ee 0.455 n 3	m 8.508 ee 1.584 n 4

Taula 24. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant els dies 20 a 79.

Anàlisi de la variança del model lineal pel CP H6-H12						
n. dades = 14		SQ. Total = 542.57		r = 0.9587		
n. var. = 3		SQ. Model = 498.67		s = 1.9974		
g. l. = 11		SQ. Error = 43.88		% V.E. = 91.91		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
Sexe	-1.4894	0.5633	-2.6437	-2.7293	-0.2494	0.0228 *
Px	0.4772	0.5576	0.8557	-0.7500	1.7044	0.410

Taula 25. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant els dies 20 a 79.

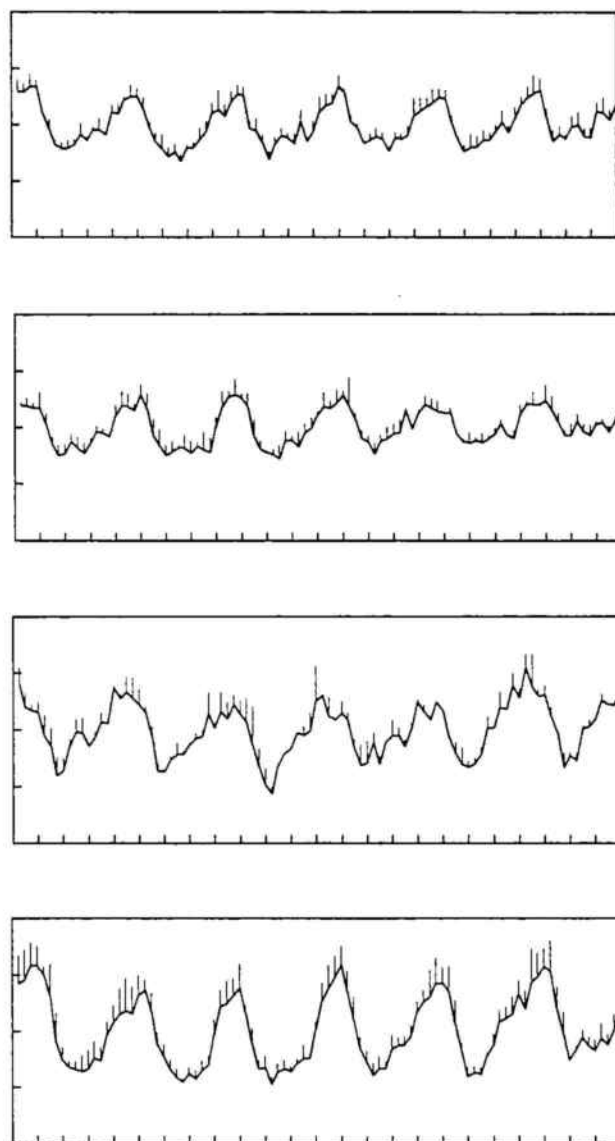


Figura 45. Formes d'ona mitjanes per a cada situació experimental durant la fase sota T4, calculades a partir de les mitjanes individuals. L'activitat motora s'expressa en unitats arbitràries respecte el temps circadiari. De dalt a baix corresponen als grups mascles-Sham, mascles-Px, femelles-Sham, femelles-Px.

Figura 46. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dos mascles. A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop processades.

Figura 47. Dobles gràfiques tractades, corresponents a dues femelles. A l'esquerra es mostren sense tractament gràfic i a la dreta un cop processades.

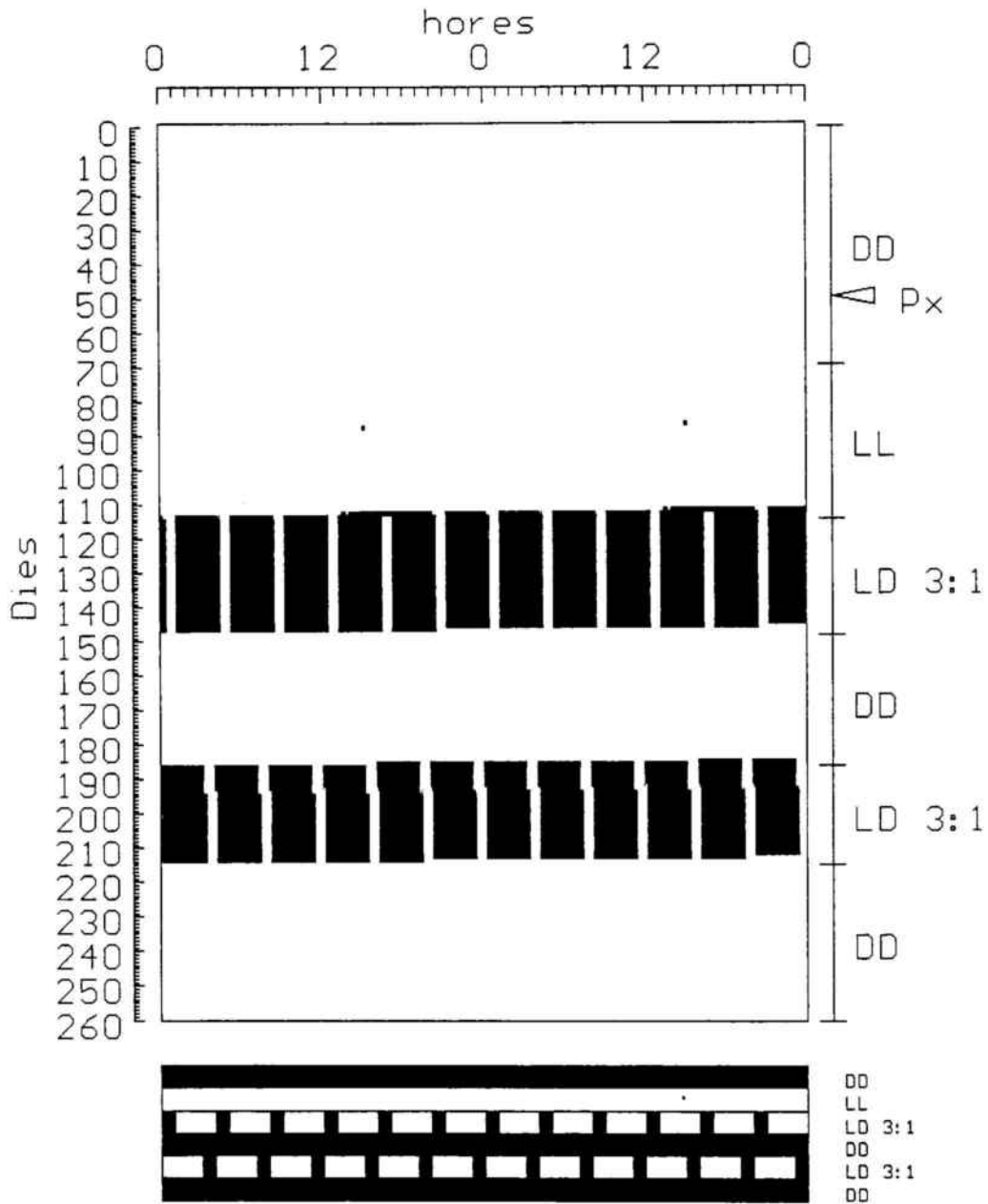


Figura 48. Doble gràfica del registre del nivell d'il·luminació, durant tot l'experiment.

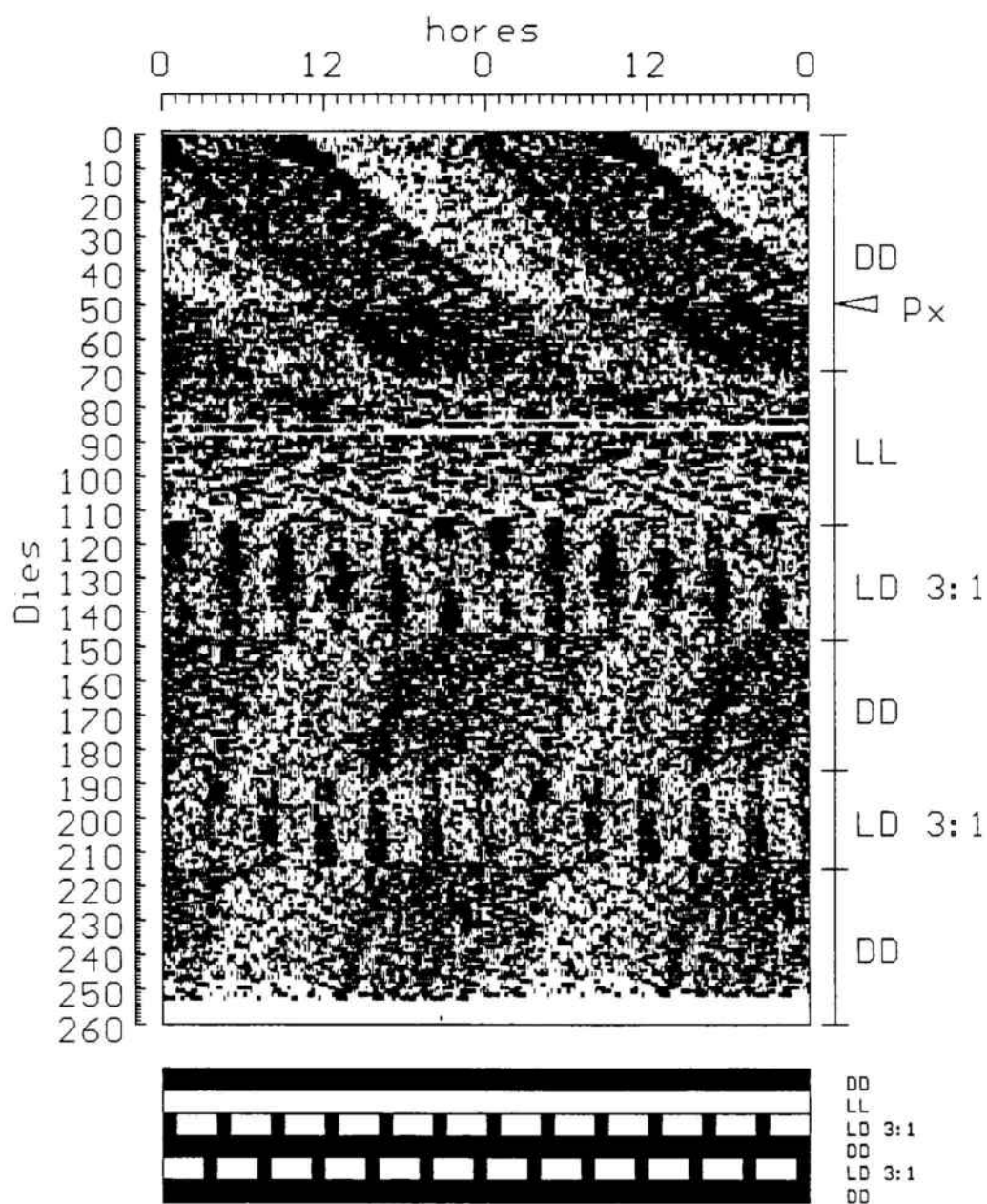


Figura 49. Doble gràfica, corresponent al mascle 8 (*Sham*).

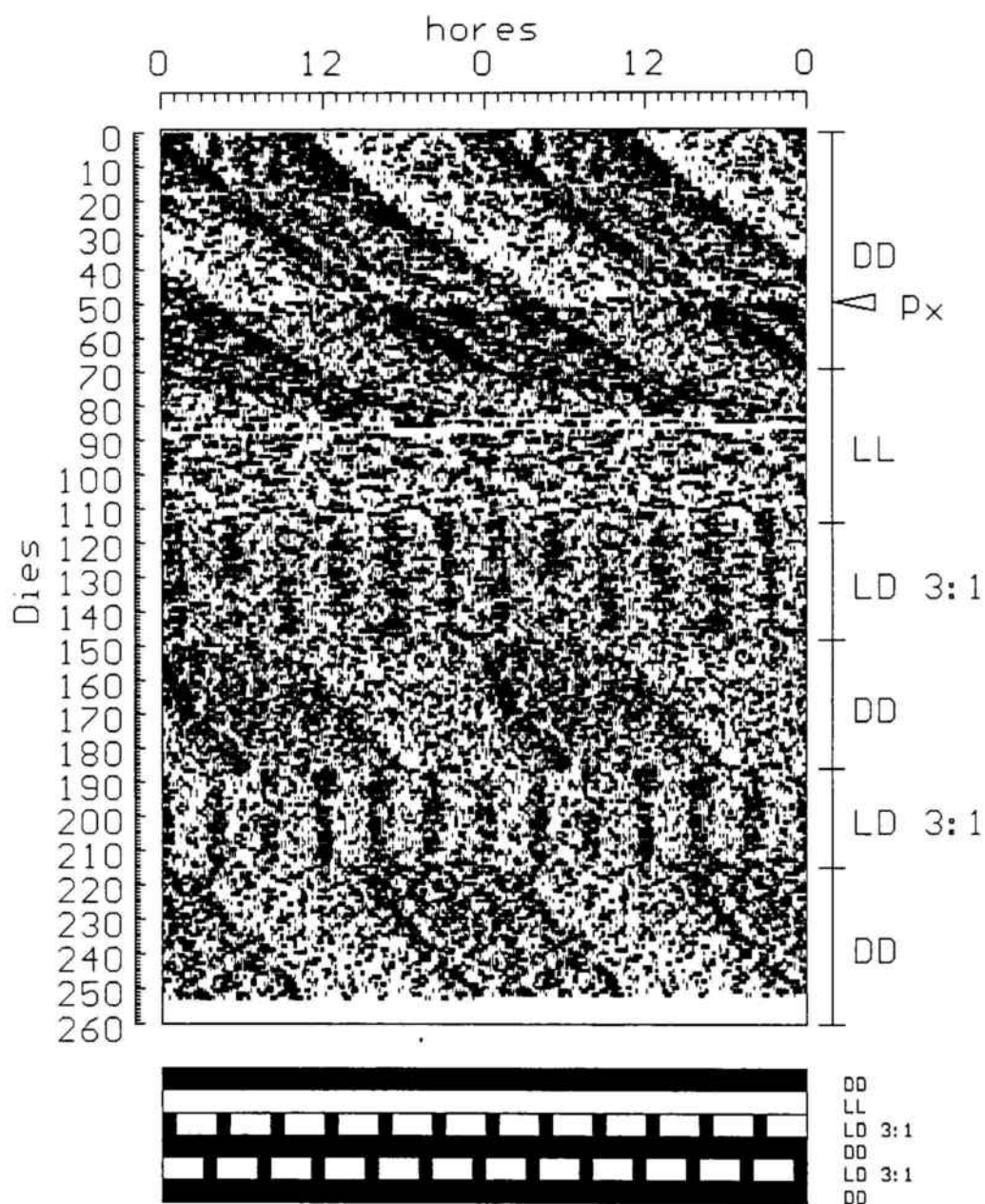


Figura 50. Doble gràfica, corresponent al mascle 18 (*Sham*).

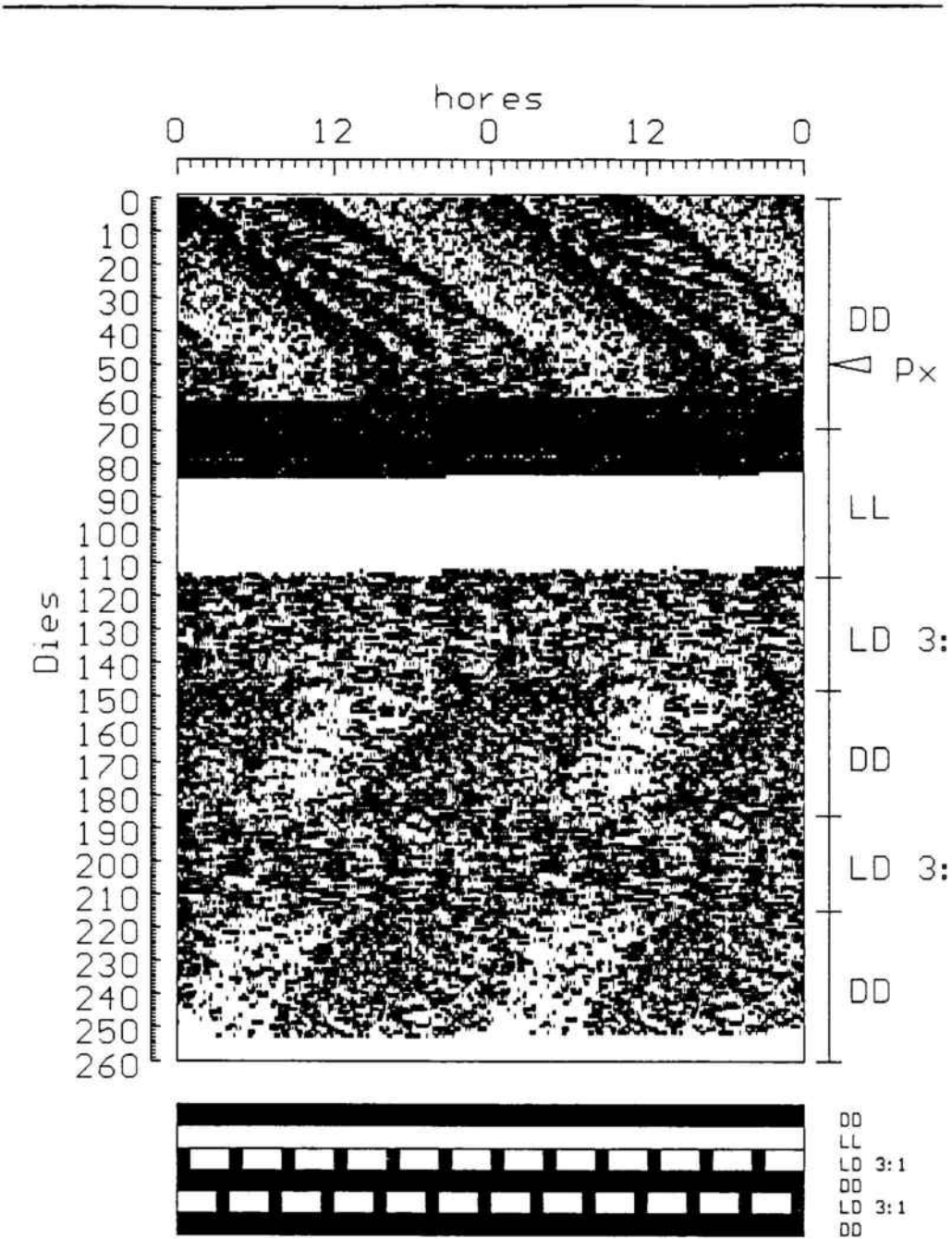


Figura 51. Doble gràfica, corresponent al mascle 28 (*Sham*).

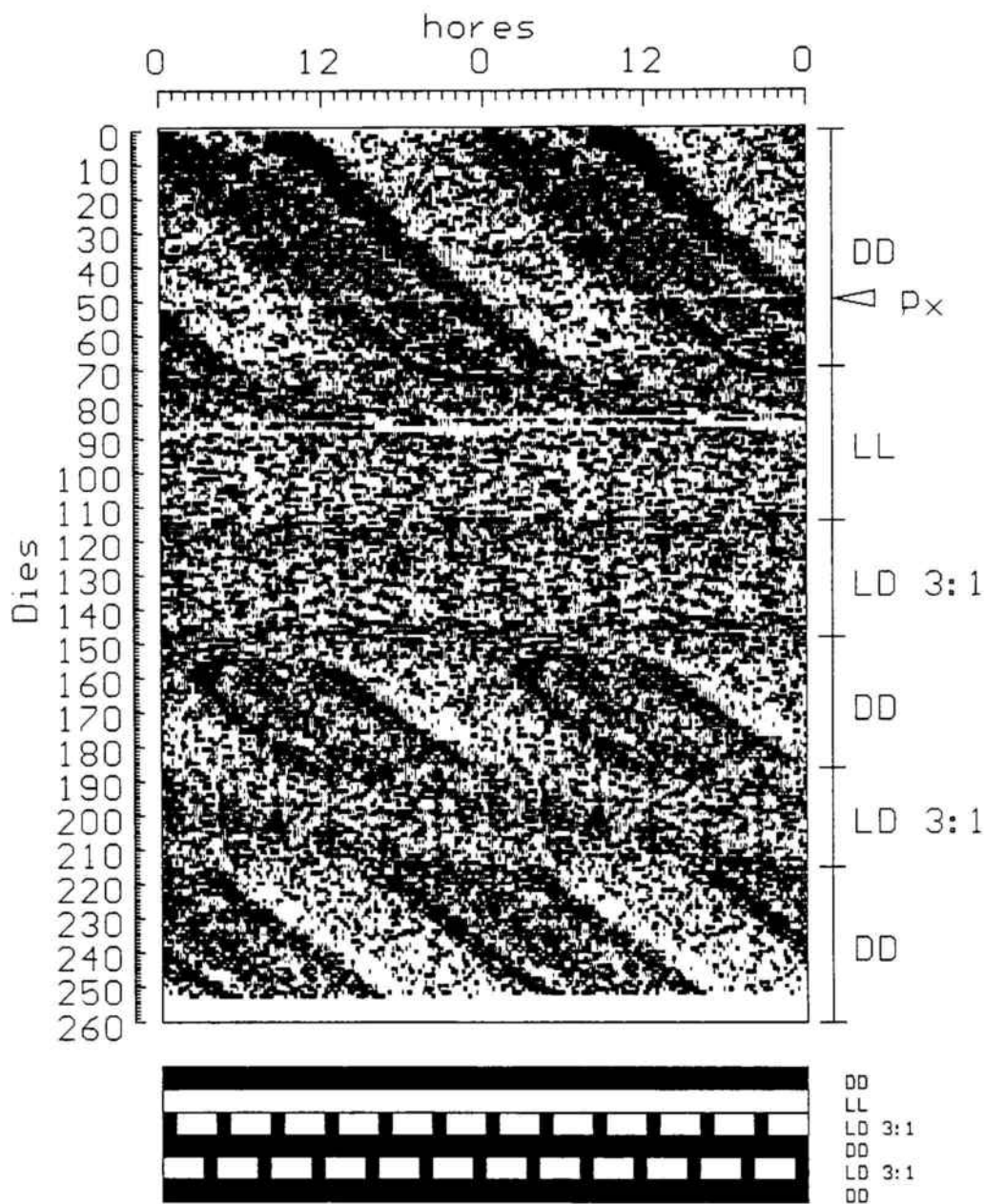


Figura 52. Doble gràfica, corresponent al mascle 38 (*Sham*).

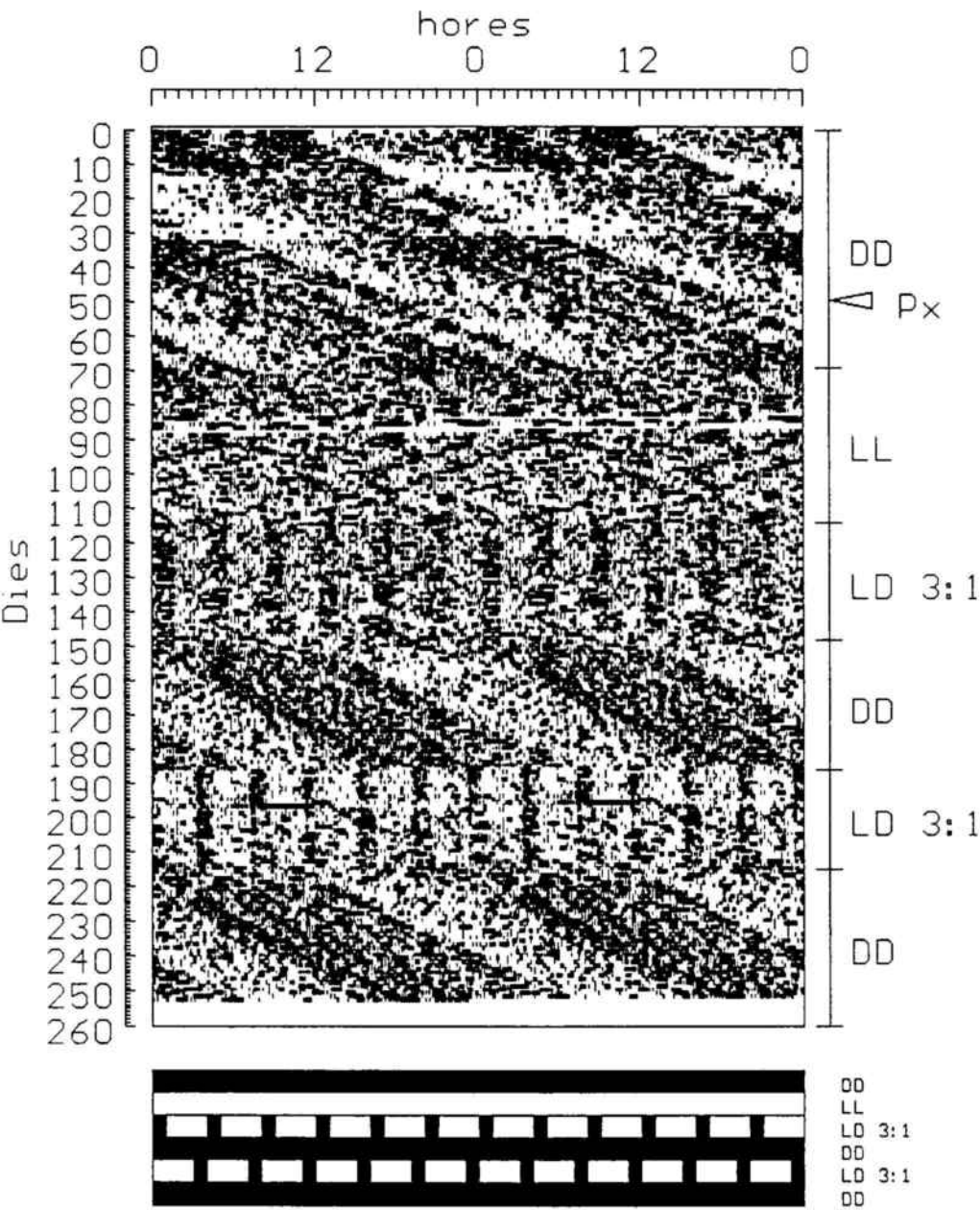


Figura 53. Doble gràfica, corresponent al múscle 13 (pinealectomitzat).

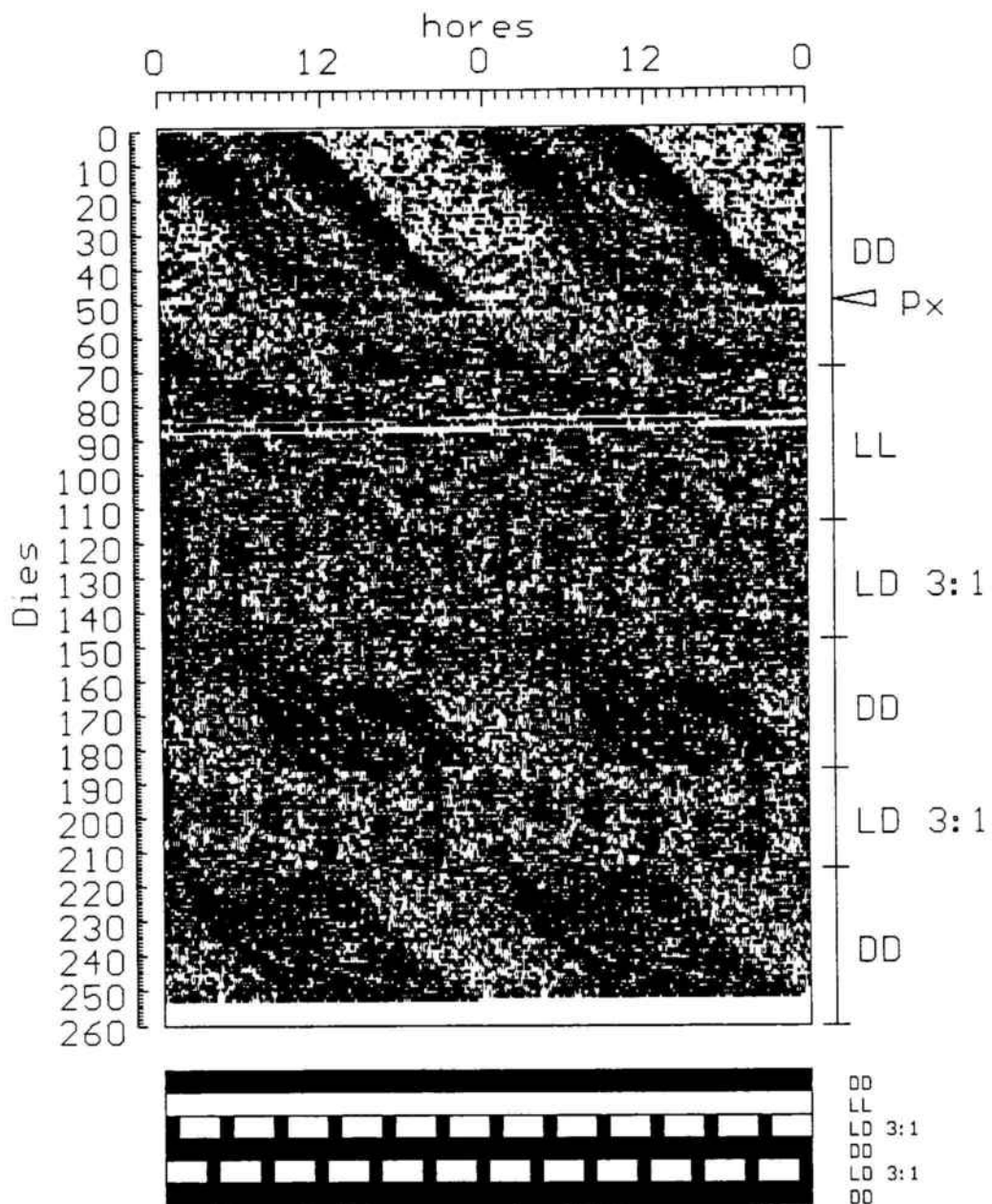


Figura 54. Doble gràfica, corresponent al mascle 23 (pinealectomitzat).

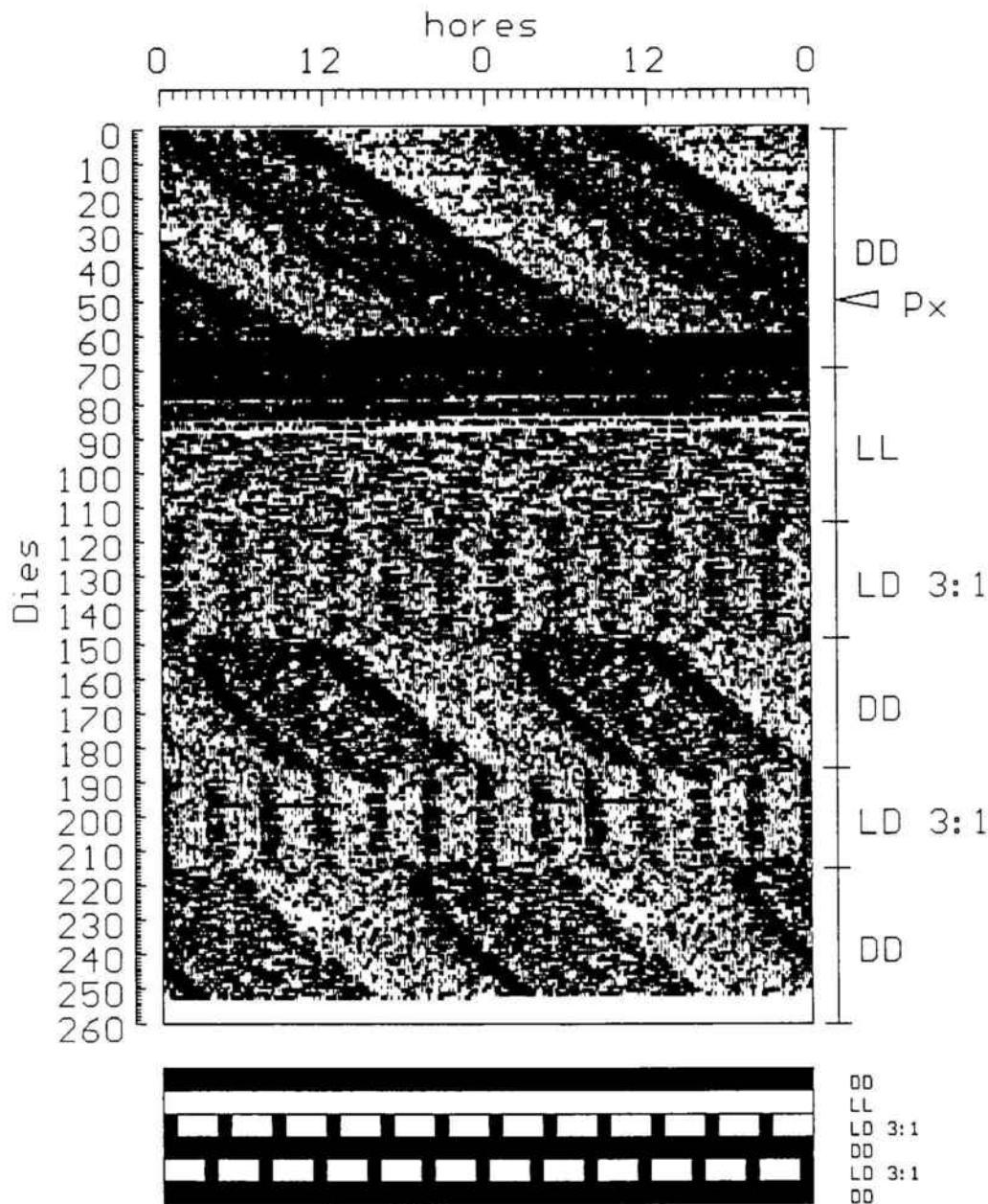


Figura 55. Doble gràfica, corresponent al mascle 33 (pinelectomitzat).

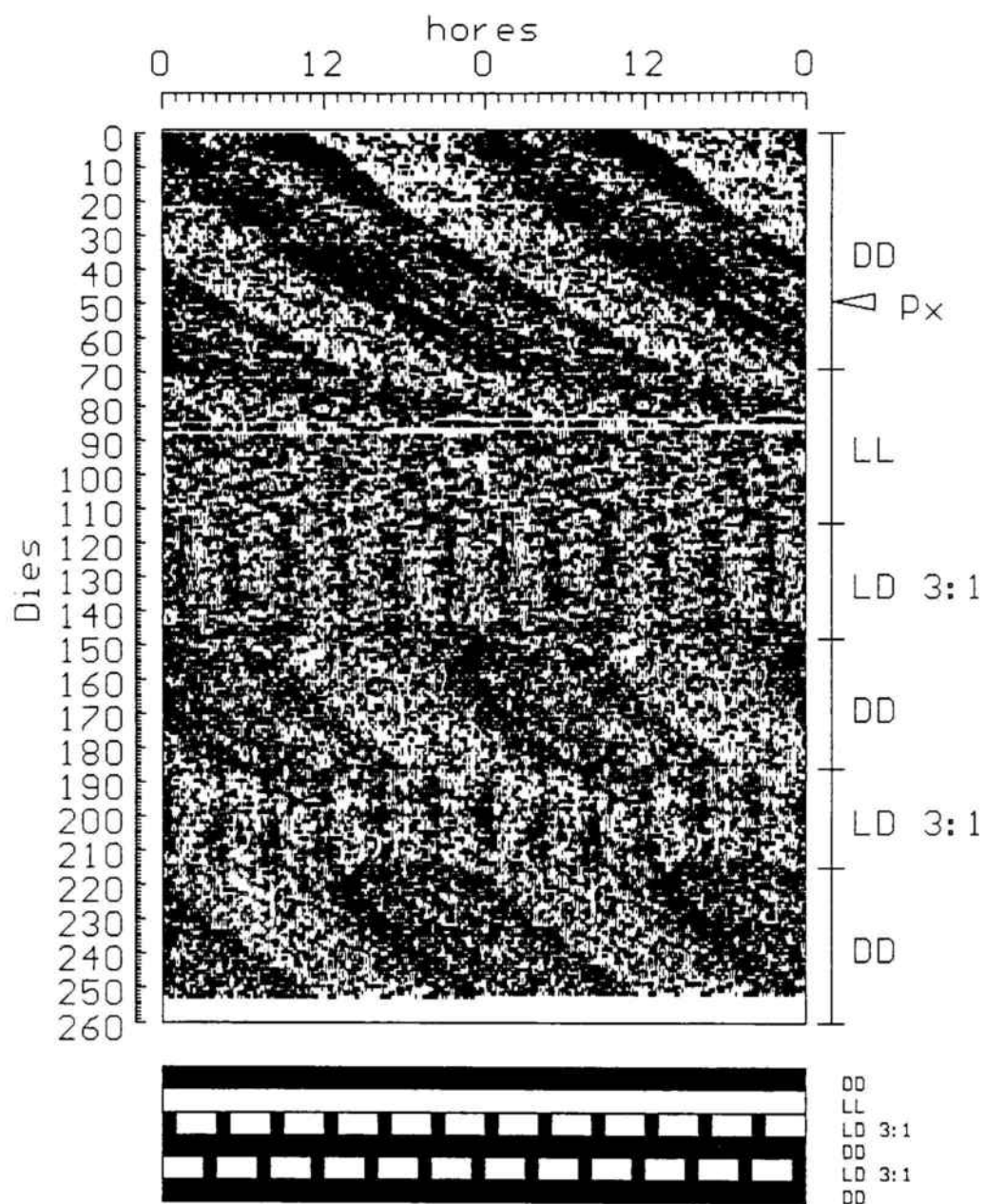


Figura 56. Doble gràfica, corresponent al mascle 43 (pinealectomitzat).

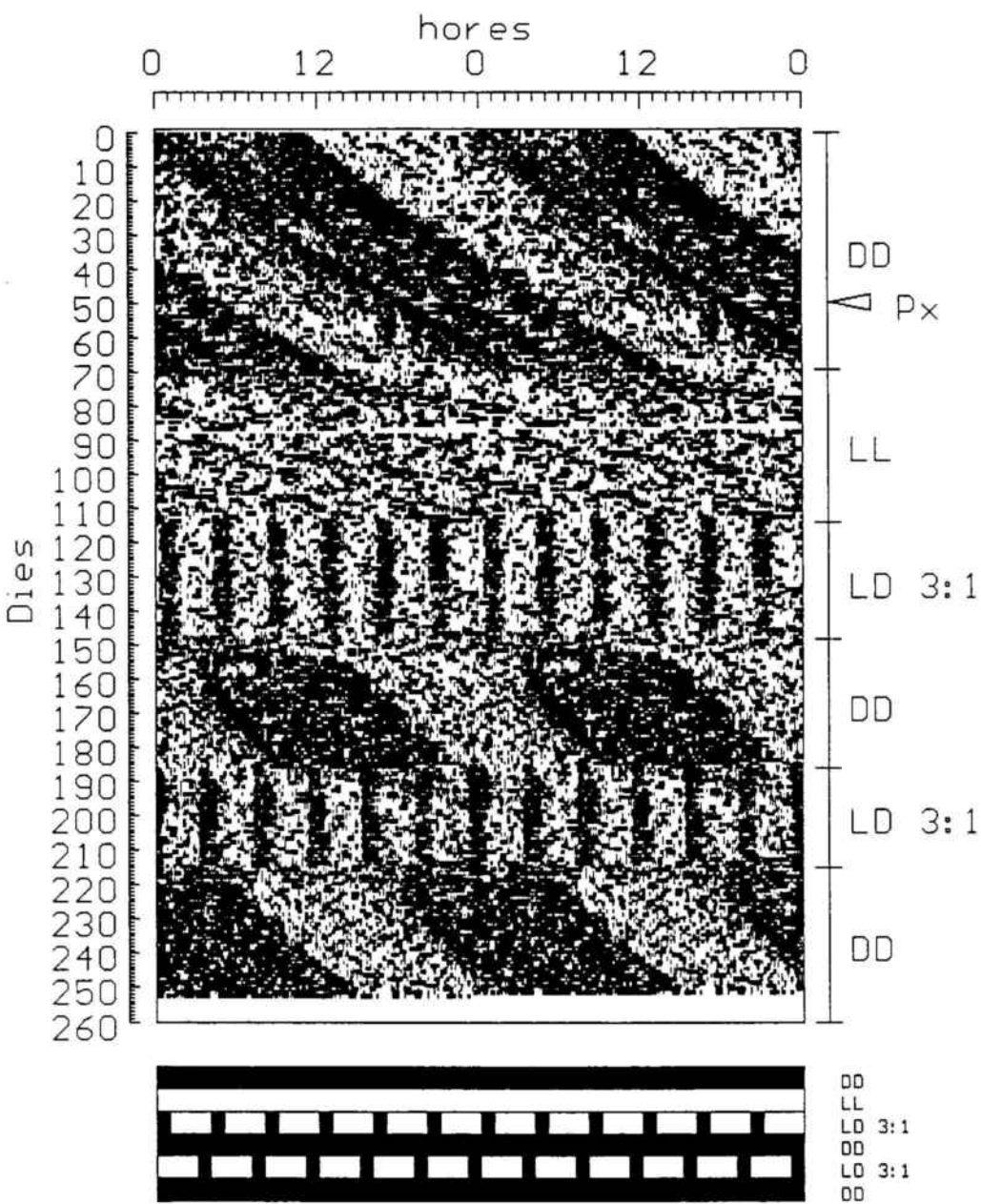


Figura 57. Doble gràfica, corresponent a la femella 48 (*Sham*).

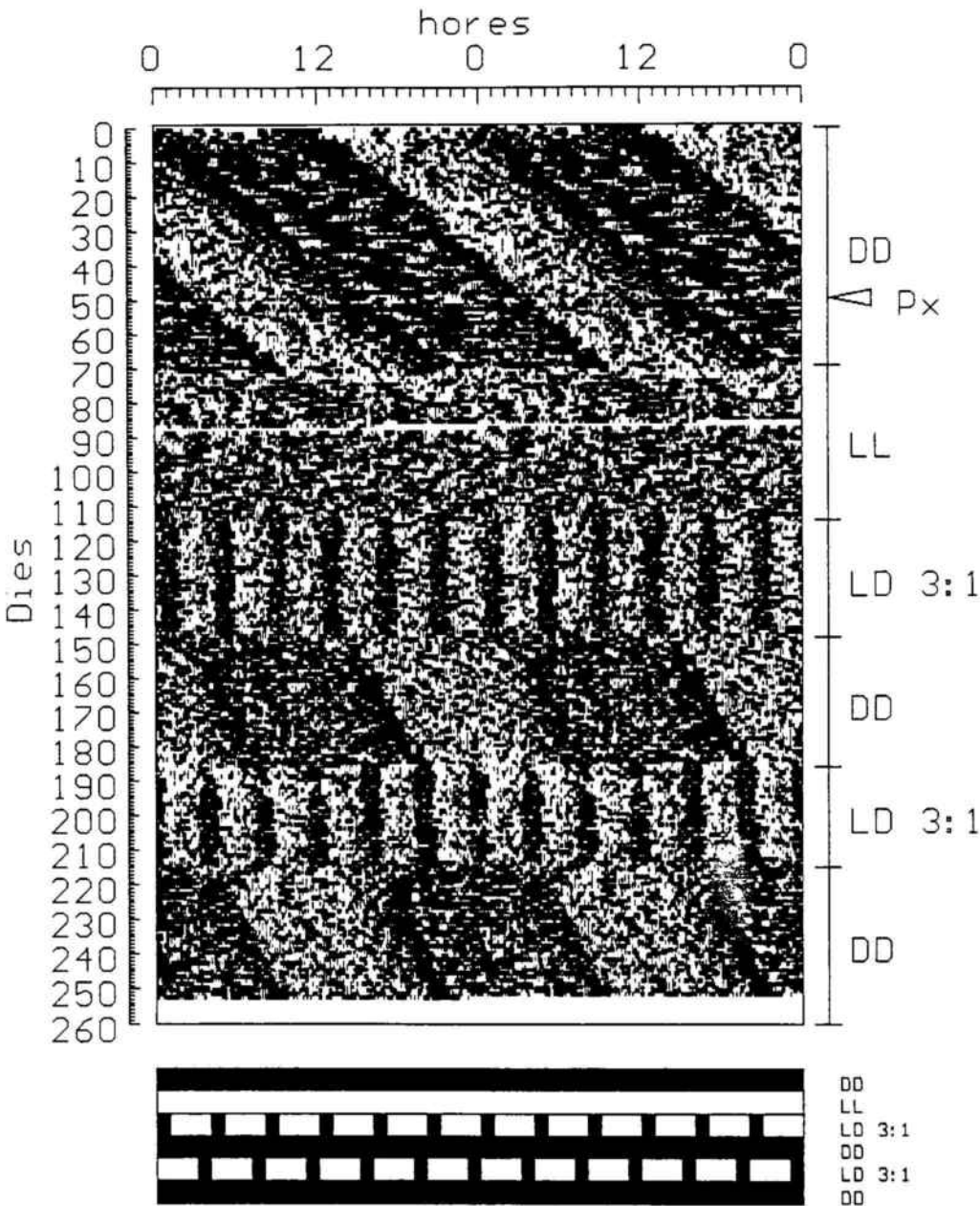


Figura 58. Doble gràfica, corresponent a la femella 58 (*Sham*).

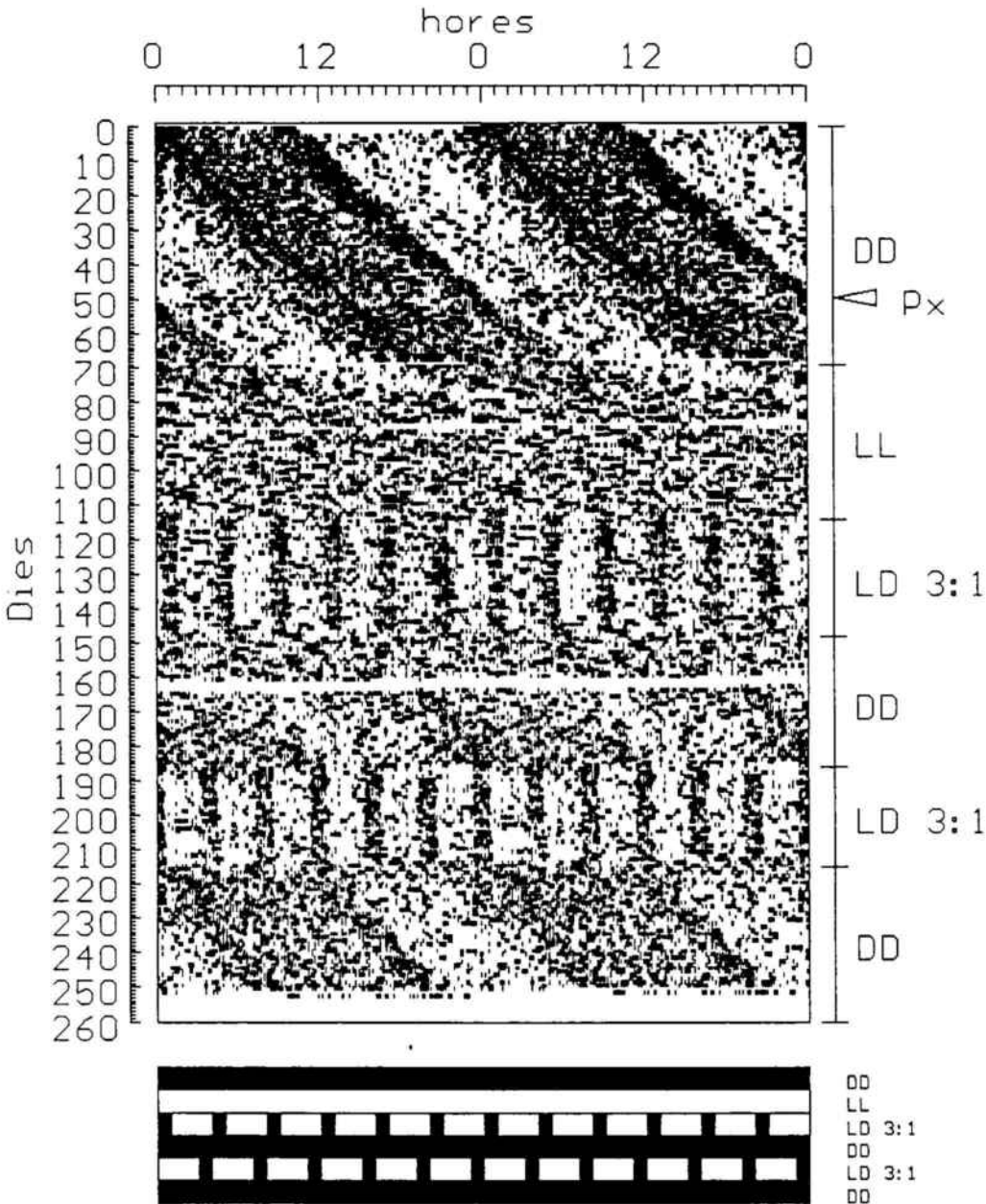


Figura 59. Doble gràfica, corresponent a la femella 68 (*Sham*).

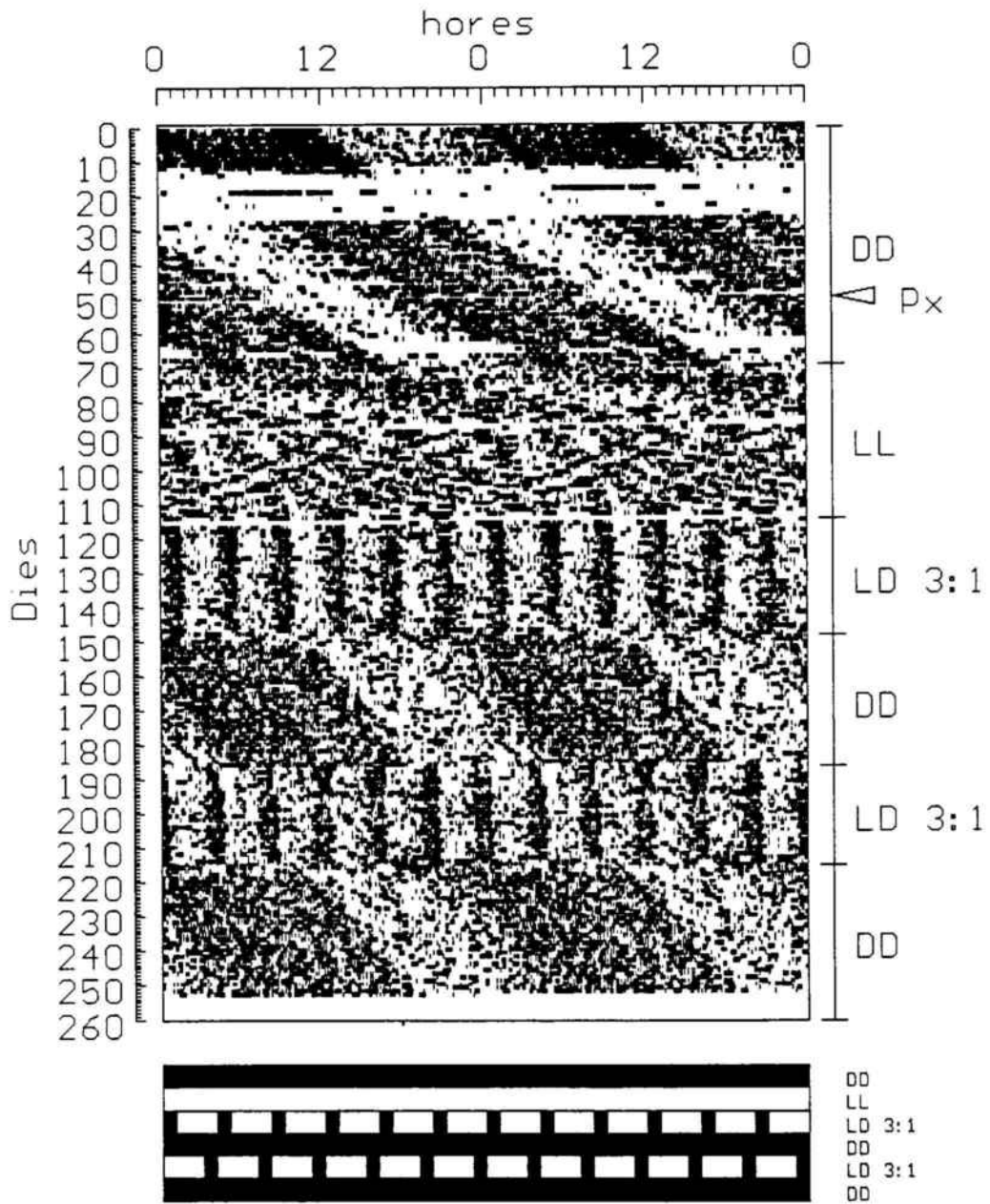


Figura 60. Doble gràfica, corresponent a la femella 78 (*Sham*).

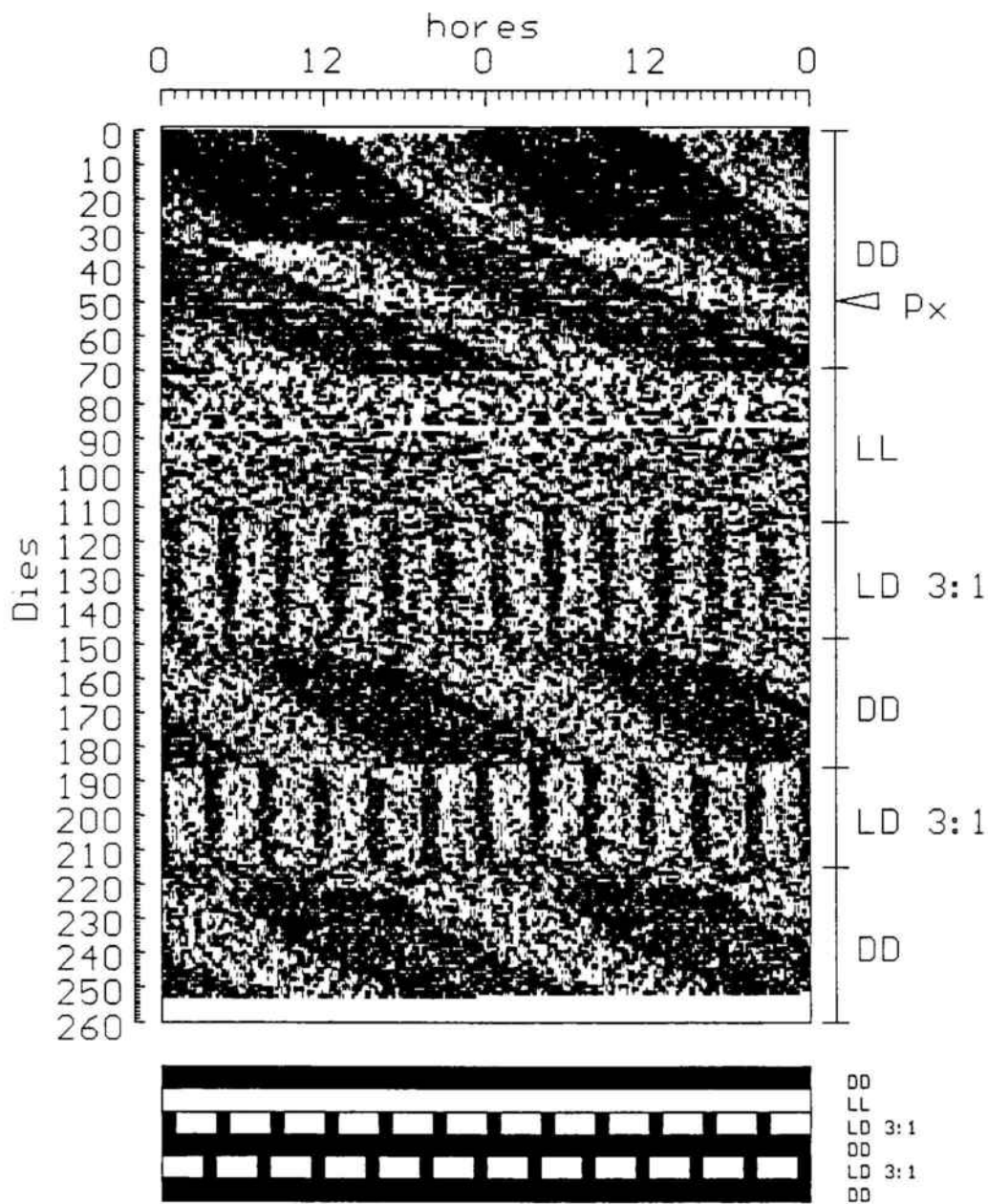


Figura 61. Doble gràfica, corresponent a la femella 53 (pinealectomitzat).

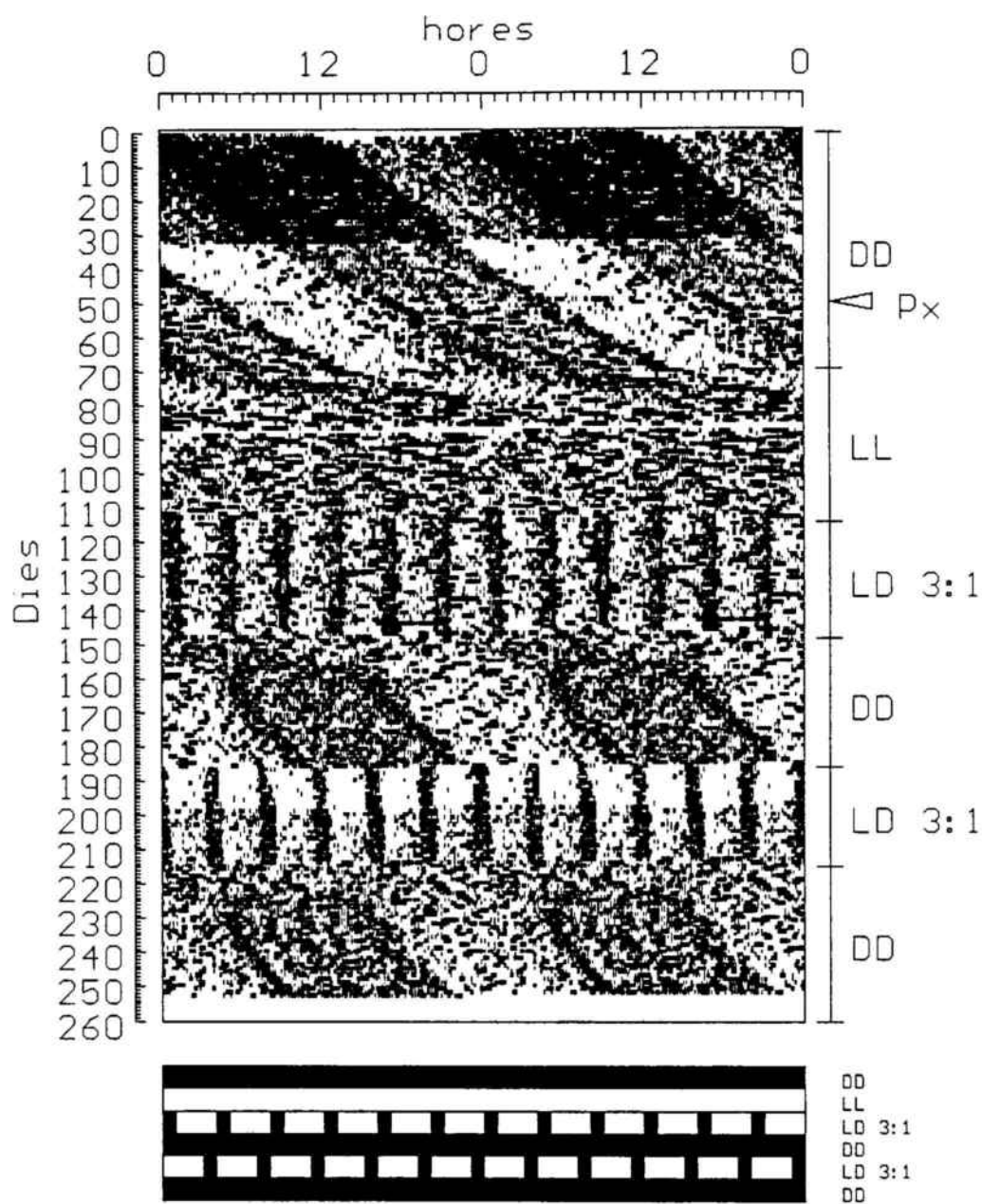


Figura 62. Doble gràfica, corresponent a la femella 63 (pinealectomitzat).

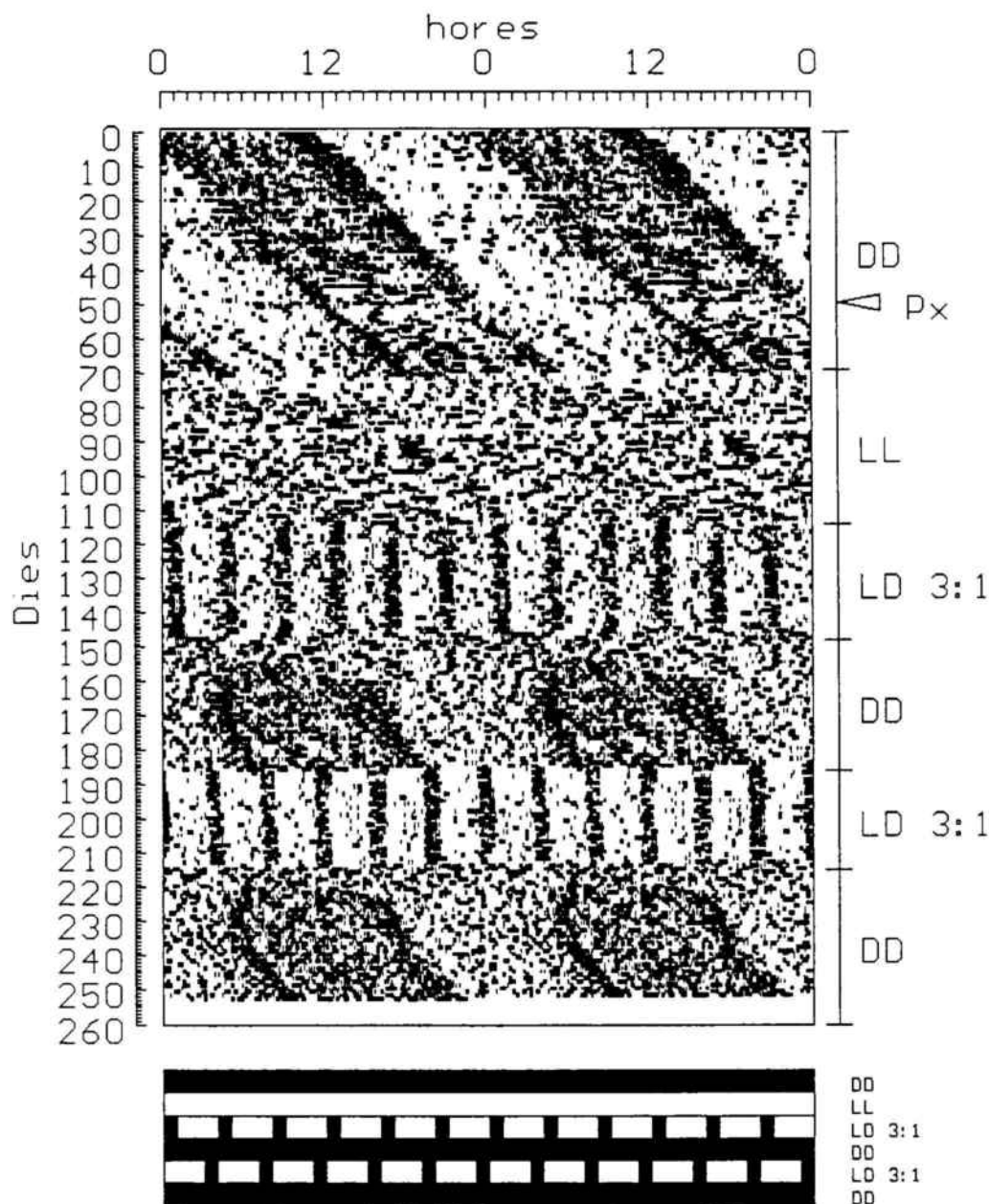


Figura 63. Doble gràfica, corresponent a la femella 73 (pinealectomitzat).

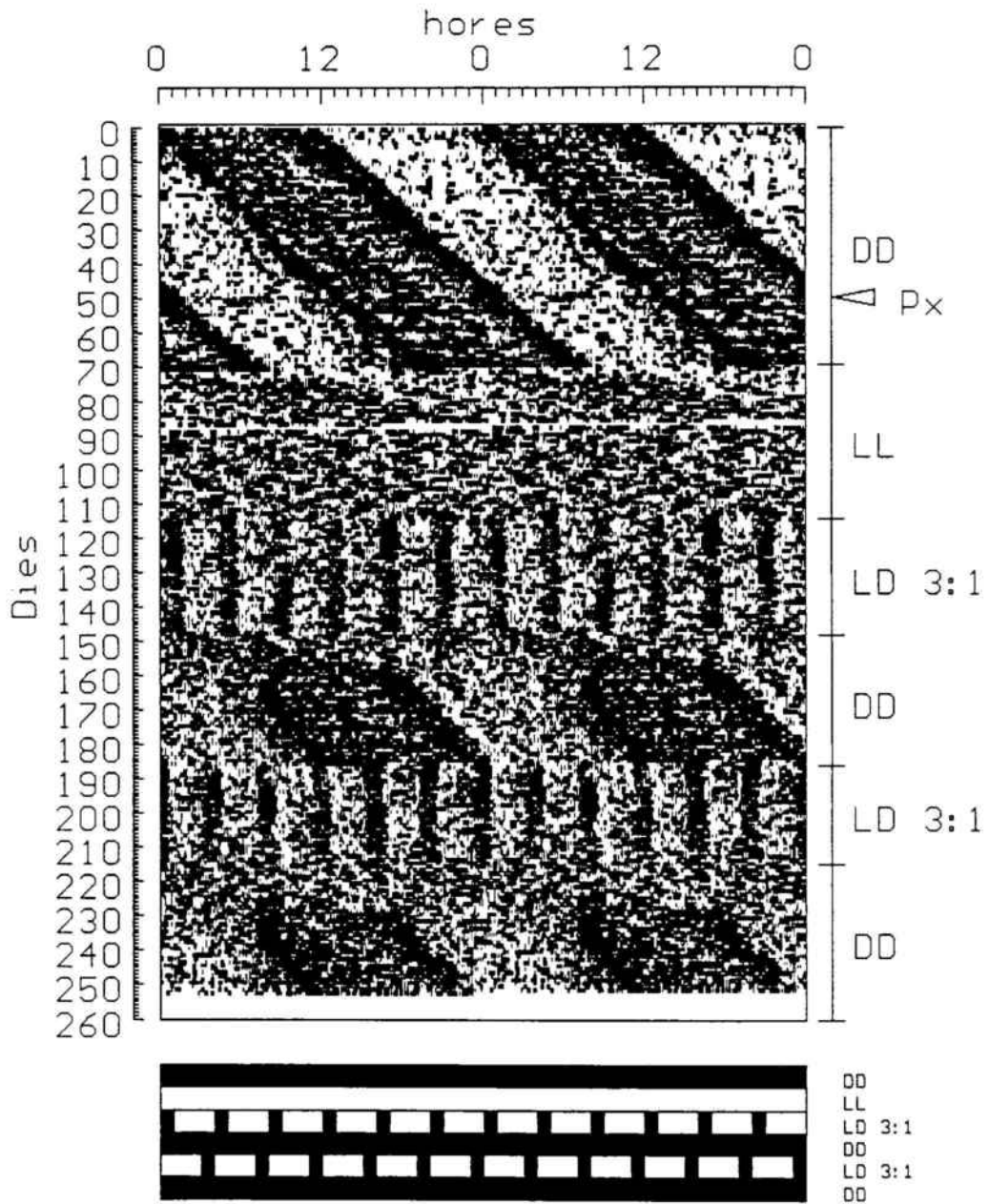


Figura 64. Doble gràfica, corresponent a la femella 83 (pinelectomitzat).

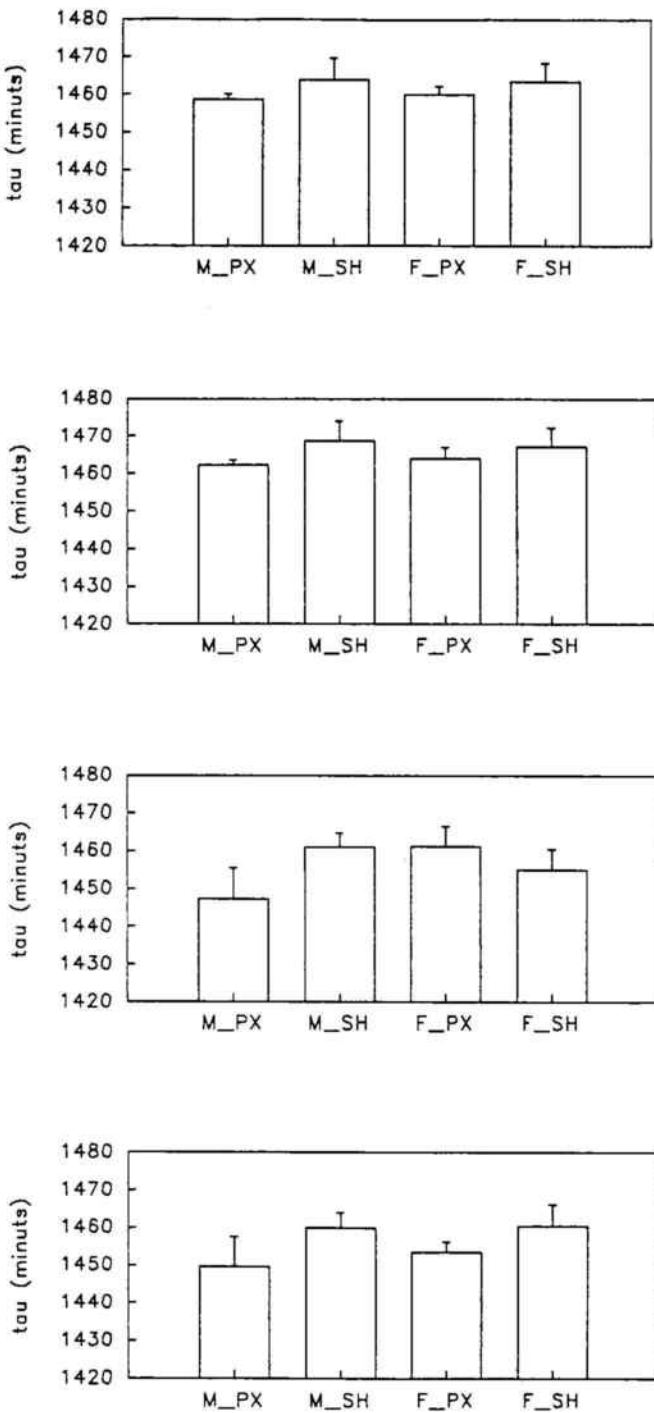


Figura 65. Representació gràfica dels valors de tau durant les diferents fases de fosc constant.

Anàlisi de la variança del model lineal pel TAU (FF2-FF1)						
n. dades = 15		SQ. Total = 344		r = 0.8096		
n. var. = 3		SQ. Model = 225.5		s = 3.1424		
g. l. = 12		SQ. Error = 118.5		% V.E. = 65.55		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	3.875	0.8152	4.7530	2.0986	5.6513	0.0004 *
sexe	0.25	0.8152	0.3066	-1.5263	2.0263	0.76
Px	-0.125	0.8152	-0.1533	-1.9013	1.6513	0.86

Taula 26. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de foscó constant F2 i F1.

Anàlisi de la variança del model lineal pel TAU (F3-F2)						
n. dades = 15		SQ. Total = 2948		r = 0.6606		
n. var. = 3		SQ. Model = 1286.77		s = 11.76		
g. l. = 12		SQ. Error = 1661.23		% V.E. = 43.65		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	-9.1153	3.0525	-2.9861	-15.7662	-2.4645	0.012 *
sexe	-1.6153	3.0525	-0.5291	-8.2662	5.0354	0.60
Px	0.8846	3.0525	0.2897	-5.7662	7.5354	0.76

Taula 27. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de foscó constant F3 i F2.

Anàlisi de la variança del model lineal pel TAU (F4-F3)						
n. dades = 15		SQ. Total = 1847		r = 0.28		
n. var. = 3		SQ. Model = 146.42		s = 11.90		
g. l. = 12		SQ. Error = 1700.57		% V.E. = 7.92		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	-0.3461	3.0884	-0.1121	-7.0752	6.3829	0.90
sexe	0.7788	3.0884	0.2522	-5.9503	7.5079	0.802
Px	-2.9711	3.0884	-0.9620	-9.7003	3.7579	0.35

Taula 28. Anàlisi de la variança de les diferències de tau entre les fases de foscó constant F4 i F3.

Figura 66. Matrius gràfiques mitjanes dels animals agrupats per sexe i tipus de manipulació. Els espectres de potència han estat calculats en base a 24 hores. Cada ratlla representa una potència del 2%. La fila de dalt correspon a animals *Sham* i la de baix als pinealectomitzats. Els mascles són a la dreta i a l'esquerra les femelles.

CP H6-H12 (T4 1)			
	SHAM	PX	TOTAL
MASCLES	m 8.2212 ds 2.0668 n 4	m 7.8668 ds 3.4520 n 4	m 8.0441 ds 2.6408 n 8
FEMELLES	m 13.22 ds 1.28 n 4	m 13.6175 ds 1.8993 n 4	m 13.4189 ds 1.5145 n 8

Taula 29. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant la primera fase sota T4.

Anàlisi de la variança del model lineal pel CP H6-H12 (T4 1)						
n. dades = 16	SQ. Total = 2023.08		r = 0.9838			
n. var. = 3	SQ. Model = 1958.21		s = 2.23			
g. l. = 13	SQ. Error = 64.87		% V.E. = 96.79			
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
sexe	-2.6874	0.5584	-4.8121	-3.8939	-1.4809	0.0003 *
Px	0.0107	0.5584	0.0191	-1.1958	1.2172	0.98

Taula 30. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant la segona fase sota T4.

CP H6-H12 (T4 2)			
	SHAM	PX	TOTAL
MASCLES	m 8.1936 ds 3.5735 n 4	m 7.7687 ds 4.3324 n 4	m 7.9812 ds 3.6835 n 8
FEMELLES	m 15.4356 ds 2.9425 n 4	m 12.1467 ds 2.2223 n 4	m 13.7912 ds 2.9863 n 8

Taula 31. Valors mitjans de la potència continguda als harmònics 6 i 12 (suma dels dos) durant la primera fase sota T4.

Anàlisi de la varianza del model linial pel CP H6-H12 (T4 2)						
n. dades = 16		SQ. Total = 2188.58		r = 0.9666		
n. var. = 3		SQ. Model = 2044.96		s = 3.3237		
g. l. = 13		SQ. Error = 143.61		% V.E. = 93.48		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
sexe	-2.9049	0.8309	-3.4960	-4.7001	-1.1098	0.0038 *
Px	-0.9284	0.8309	-1.1173	-2.7235	0.8667	0.28

Taula 32. Anàlisi de la variança dels valors de la suma de potència continguda als harmònics 6 i 12 durant la segona fase sota T4.

FASES ONA MITJANA (T4 1 - T4 2)		
	SHAM	PX
MASCLES	m -0.13 n 3	m -0.13 n 4
FEMELLES	m -0.51 n 4	m -0.51 n 4

Taula 33. Valors mitjans de les diferències de fases relatives (activitat respecte fosc) entre T4₁ i T4₂.

Anàlisi de la varianza del model linial per les FASES DE L'ONA (T4 1 - T4 2)						
n. dades = 16		SQ. Total = 2023.08		r = 0.9838		
n. var. = 3		SQ. Model = 1958.21		s = 2.23		
g. l. = 13		SQ. Error = 64.87		% V.E. = 96.79		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
Px	0.065	0.0958	0.6783	-0.2009	0.3309	0.50
sexe	0.1475	0.0479	3.0787	0.0145	0.2805	0.036 *
T4 1/T4 2	0.16	0.0479	3.3396	0.0270	0.2929	0.028 *

Taula 34. Anàlisi de la varianza dels valors de les diferències de fases relatives (activitat respecte fosc) entre T4₁ i T4₂.

INCREMENT D'ACTIVITAT PREVIA A LA FOSCOR (T4 1)		
	SHAM	PX
MASCLES	m 3.6023 ds 2.8542 n 4	m 0.6016 ds 2.5993 n 4
FEMELLES	m 5.2177 ds 5.5116 n 4	m 6.1362 ds 4.9402 n 4

Taula 35. Valors mitjans dels increments d'activitat previs a la foscor, durant la primera fase sota T4.

Anàlisi de la varianza del model linial per la FASE D'ACTIVITAT PREVIA A LA FOSCOR (T4 1)						
n. dades = 16		SQ. Total = 521.93		r = 0.7549		
n. var. = 3		SQ. Model = 297.51		s = 4.1549		
g. l. = 13		SQ. Error = 224.42		% V.E. = 57.00		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	4.4100	1.4689	3.0021	1.2365	7.5835	0.01 *
sexe	-1.7875	1.0387	-1.7208	-4.0315	0.4565	0.11
Px	-1.0411	2.0774	-0.5011	-5.5291	3.4469	0.62

Taula 36. Anàlisi de la varianza dels valors dels increments d'activitat previs a la foscor, durant la primera fase sota T4.

INCREMENT D'ACTIVITAT PREVIA A LA FOSCOR (T4 2)		
	SHAM	PX
MASCLES	m 0.6298 ds 2.1782 n 4	m -0.4456 ds 3.2807 n 4
FEMELLES	m 4.9396 ds 5.8833 n 4	m 3.2964 ds 3.0802 n 4

Taula 37. Valors mitjans dels increments d'activitat previs a la foscor, durant la segona fase sota T4.

Anàlisi de la varianza del model linial per la FASE D'ACTIVITAT PREVIA A LA FOSCOR (T4 2)						
n. dades = 16		SQ. Total = 322.27		r = 0.6664		
n. var. = 3		SQ. Model = 143.12		s = 3.7122		
g. l. = 13		SQ. Error = 179.15		% V.E. = 544.41		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
constant	2.7847	1.3124	2.1217	-0.0507	5.6201	0.052
sexe	-2.0129	0.9280	-2.1689	-4.0179	-0.0080	0.050
Px	-1.3593	1.8561	-0.7323	-5.3692	2.6506	0.48

Taula 38. Anàlisi de la varianza dels valors dels increments d'activitat previs a la foscor, durant la segona fase sota T4.

PES CORPORAL (g)		
	SHAM	PX
MASCLES	m 537.50 ds 54.54 n 4	m 652.66 ds 55.19 n 3
FEMELLES	m 302.50 ds 40.31 n 4	m 348.75 ds 34.73 n 4

Taula 39. Valors mitjans dels pesos dels animals al final de l'experiment.

Anàlisi de la variança del model linial pel PES CORPORAL						
n. dades = 15		SQ. Total = 3309589		r = 0.99		
n. var. = 3		SQ. Model = 3281693		s = 48.21		
g. l. = 12		SQ. Error = 27895.57		% V.E. = 99.16		
causa variació	m	e.s.	t stud.	lim.inf.	lim. sup.	p
sexe	133.4038	12.5086	10.6649	106.1500	160.6576	0.00001 *
Px	39.0288	12.5086	3.1201	11.7750	66.2827	0.008 *

Taula 40. Anàlisi de la variança dels valors dels pesos dels animals al final de l'experiment.