

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades.

CRONOBIOLOGIA DEL BOSTEZO

Tesis de Especialización en Estadística
Aplicada que presenta

MILENA HOLMGREN URBA

Aesor Académico : M. en C. Guillermo Baz

México, D.F.

SECRETARIA DE ASUNTOS
ESCOLARES

1988.



Unidad Académica de los
Ciclos Profesional y de Posgrado
del C. C. H.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Agradecimientos	
Sinopsis	
Introducción	2
Sección II :	7
Experimentos Preliminares	
Sección III :	15
- Objetivo e Hipótesis	
- Metodología Experimental	
- Metodología Estadística	
Sección IV :	21
- Resultados y Discusión	
- Conclusiones	
Bibliografía	30

SINOPSIS

En la introducción de este trabajo se reseñan los conocimientos actuales sobre los ritmos circadianos y la conducta del bostezo.

En la segunda sección se discute un trabajo previo que sirve de base para el presente estudio.

En la tercera sección se plantean claramente el objetivo y la hipótesis bajo experimentación y se describen las metodologías experimental y estadística empleadas.

En la cuarta sección se discuten los resultados obtenidos y se presentan las conclusiones.

INTRODUCCION

Los Ritmos Circadianos

Los ritmos circadianos son cambios periódicos en parámetros metabólicos o de la conducta de los seres vivos con una duración aproximada de 24 - 25 hrs. Se ha postulado que son controlados por osciladores biológicos endógenos.

La presencia de ritmos circadianos se ha encontrado en prácticamente todas las formas vivientes, caracterizando a la mayoría de las funciones fisiológicas, bioquímicas y psicológicas de los organismos.

La sincronización de estas funciones con las variaciones medioambientales diarias más evidentes tiene una gran importancia adaptativa, ya que permite generar conductas anticipatorias que incrementan la eficiencia de un proceso biológico, y regular temporalmente funciones relacionadas entre sí (8). Los ritmos circadianos también juegan un papel importante en las relaciones entre especies, en algunos casos, por ejemplo, permiten que animales de especies diferentes compartan las mismas fuentes alimenticias sin competir directamente (7). Se ha observado una sincronización de los ritmos circadianos con cambios periódicos en algunas variables externas, sobre todo la iluminación, cuyos periodos se acercan también a las 24 horas.

Una de las evidencias más claras del carácter endógeno y activo de estos ritmos es su persistencia, por un cierto tiempo, aun cuando los organismos son cambiados a condiciones ambientales constantes y diferentes a las originales. Se ha demostrado, también, que estos ritmos son innatos y susceptibles de manipulación genética (8,10,17).

Después de este periodo de continuidad rítmica, los ritmos manifiestan ligeras variaciones en su duración y pueden producirse desincronizaciones en funciones que, bajo condiciones normales, estaban muy relacionadas temporalmente. También pueden ocurrir depresiones en la expresión de una conducta. Los desfases producidos dependen de la especie estudiada, de las características del estímulo, así como del tiempo, respecto al ritmo interno, en que fueron aplicados.

Actualmente se piensa que los ritmos circadianos que regulan las actividades biológicas de los organismos superiores, particularmente los mamíferos, forman un sistema en el cual cada conducta es regulada por un oscilador o, al menos, uno es el que ejerce el papel principal. A su vez cada oscilador puede regular varios procesos rítmicos de funciones relacionadas. Se ha postulado, también, la posibilidad de que estos osciladores endógenos estén acoplados y que las variaciones medioambientales diarias permitan el ajuste de sus periodos a una duración cercana a las 24 horas. Esto explicaría la desincronización observada

cuando se debilita o se anula la retroalimentación de un organismo con algunas variables externas (8).

Otros dos hallazgos que apoyan la existencia de una regulación temporal interna, al menos en los mamíferos, ha sido la identificación de una región del hipotálamo, el núcleo supraquiasmático (NSQ), que parece ser el sustrato anatómico de uno de los osciladores propuestos. En los primates y los roedores se ha podido demostrar, si bien no localizar, que el NSQ no es el único oscilador biológico, pues la temperatura corporal y las respuestas anticipatorias a la disponibilidad diaria de alimento no ven afectada su ritmicidad cuando se provocan lesiones de dicho núcleo (8).

En los roedores se ha demostrado que la ingestión de alimento exhibe un patrón circadiano. Es una actividad básicamente nocturna, que se incrementa entre las 16.00 y 24.00 hrs., con un máximo alrededor de las 20.00 hrs. (16).

En estos mamíferos, como en algunos otros, se han observado respuestas rítmicas, anticipatorias a la disponibilidad de alimento, en la actividad locomotora, la movilización de enzimas digestivas y en la actividad endocrina (8).

El Bostezo

El bostezo es una conducta innata caracterizada por una inspiración profunda, acompañada por una abertura progresiva de la boca y una expansión de las cavidades faríngea, laríngea y torácica, que es seguida por una fase espiratoria más corta. Simultáneamente se produce una contracción de varios músculos esqueléticos (11).

Existe polémica sobre la homología funcional de conductas orales semejantes al bostezo presentes en peces, anfibios, reptiles y aves (2,11). Sin embargo, en los mamíferos el bostezo es un acto habitual, pero de incidencia variable. En general, se cuenta con menor información del bostezo en herbívoros que en carnívoros (2) y omnívoros.

El bostezo ha sido comúnmente asociado con las etapas de transición entre la vigilia y el sueño o con situaciones de baja estimulación. También se ha reconocido su papel en la comunicación social de los peces, los cánidos (2), los primates (9) y el hombre (18).

Clinicamente es un signo frecuente en ciertas enfermedades del sistema nervioso central, así como de anemias, hemorragias y algunos padecimientos gástricos (2,11).

Aún no se conoce con precisión la significación fisiológica, ni los mecanismos responsables de su regulación. Sin embargo, la investigación farmacológica de

los últimos años ha permitido postular un modelo de organización de los mecanismos que controlan esta conducta (1,2).

Con la intención de correlacionar variaciones circadianas en la actividad de los sistemas neurotransmisores propuestos en la regulación del bostezo con las variaciones diarias en su manifestación, se ha estudiado el ritmo de bostezo en roedores utilizando a la luz como sincronizador. Se ha trabajado con bostezos espontáneos e inducidos farmacológicamente y bajo condiciones de iluminación natural y artificial (1).

Prosiguiendo en esta línea se ha hecho un esfuerzo por correlacionarlo con las variaciones en la disponibilidad de alimento.

EXPERIMENTOS PRELIMINARES

En un intento por estudiar comparativamente el papel de la luz y el régimen alimenticio como sincronizadores de la conducta diaria del bostezo, el Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla (U.A.P.) realizó una serie de experimentos que se resumen en el cuadro 1 .

Se sometieron distintos grupos de animales a los siguientes tratamientos :

- 1) luz continua (LL) y alimentación disponible durante todo el día (ad libitum).
- 2) luz continua y alimentación restringida, con variaciones en el periodo de disponibilidad alimenticia entre:
 - _ 8.00 y 10:30
 - _ 12:00 y 14:00
 - _ 14:00 y 17:00
- 3) ciclo de luz / oscuridad (LD) de 12 / 12 hrs. (luz entre 7.00 - 19.00) y alimentación restringida entre las 9.00 y 11.00 horas.
- 4) ciclo de luz / oscuridad de 12 / 12 hrs. (luz entre 7.00 - 19.00) y alimentación ad libitum.

Se estudió un ciclo completo de 24 horas de cada animal en sesiones de observación de diferente duración e irregularmente distribuidas a lo largo de varios días. El resto de la metodología experimental fue muy similar a la que se describe posteriormente en este trabajo.

CUADRO 1

Condiciones Experimentales	Periodo de Medición	Grupo	Jaula	Animal
LL ad libitum n = 8	18 días	1	1	1,2
			2	3,4
	10 días	2	3	5,6
			4	7,8
24 horas	3	3	5,6	
		4	7,8	
LL alimentación restringida n = 14	24 horas	4	5	9,10,11
			6	12,13,14
	21 días	5	7	15,16
			8	17,18
33 días	6	1	1,2	
		2	3,4	
LD alimentación restringida n = 6	24 horas	7	9	19,20,21
			10	22,23,24
LD ad libitum n = 14	15 días	8	11	25,26
			12	27,28
			13	29,30
	15 días	9	14	31,32
			15	33,34
			16	35,36
			17	37,38

Los datos habían sido analizados empleando técnicas estadísticas para el análisis de datos circulares. Este enfoque es muy útil para describir patrones de orientación espacial o temporal, especialmente de un modo gráfico.

Para ello, las variables registradas, por ejemplo, el instante en que se presenta un fenómeno, se transforman en ángulos en un círculo unitario. Con los vectores de estos ángulos es posible construir estadísticas descriptivas de tendencia central, de dispersión y realizar algunas pruebas de hipótesis.

Para estudiar la ocurrencia temporal de una conducta, las escalas de medición del tiempo se hacen corresponder con los 360 grados del círculo, en nuestro caso las 24 horas del día.

La mayor parte de las técnicas desarrolladas para el análisis de datos circulares requieren que éstos satisfagan el supuesto de independencia estadística. En estudios temporales y particularmente los enfocados a los ritmos biológicos es muy importante recordar esta suposición, ya que generalmente, los datos son recolectados de un modo secuencial con la finalidad de encontrar el periodo que caracteriza a una conducta. Esto genera entonces dependencia entre las observaciones (3).

En el análisis de los experimentos se habían transformado en ángulos las frecuencias de bostezos de cada animal a lo largo de las 24 horas, calculando la dirección promedio con todos los vectores de los animales sometidos al

mismo tratamiento. Consideramos que éste no era el modo adecuado de utilizar la técnica por las siguientes razones:

- las observaciones provenientes de un mismo animal no son independientes.
- los registros de los animales con frecuencias más altas de bostezos gravitan más en los resultados.

Para conocer cómo se estaban distribuyendo los bostezos a lo largo del día se contrastaron cada uno de los grupos contra una distribución uniforme utilizando una prueba de χ^2 (6). En todos los casos se rechazó esta hipótesis nula ($p = 0.00$).

Los grupos 1, 2 y 3, cuyos animales fueron sometidos a luz constante y tuvieron disponibilidad de alimento durante todo el día, mostraron residuales positivos altos, es decir valores observados mayores a los esperados, repartidos durante las 24 horas reflejando una posible desorganización del ritmo circadiano.

Los grupos 4, 5 y 6 estuvieron integrados por animales mantenidos bajo iluminación continua y alimentación restringida. En los dos primeros grupos se presentaron los residuales positivos más grandes en las tres horas anteriores al ofrecimiento del alimento y en el grupo 6 en las dos horas anteriores. Esta conducta anticipatoria podría estar indicando una sincronización con la comida.

En el grupo 7 los animales estuvieron mantenidos bajo un ciclo de luz / oscuridad de 12 hrs. / 12 hrs. y con un

régimen de alimentación restringido. Nuevamente los residuales positivos más grandes se encontraron en las tres horas anteriores a la disponibilidad de comida. Sin embargo, no se presentaron valores grandes en horas cercanas al anochecer, lo que quizás podría sugerir que la comida puede actuar como un sincronizador más importante que la luz.

Los grupos 8 y 9 formados por animales sometidos a un ciclo de luz / oscuridad como el descrito anteriormente y con disponibilidad de alimento durante las 24 hrs., presentaron el residual positivo más alto entre las 17-19 hrs., con algunos otros valores grandes repartidos sin ningún patrón evidente en otros horarios. Este resultado podría estar mostrando una sincronización del ritmo de bostezos con la alternancia luz / oscuridad.

Para conocer si los animales pertenecientes a un mismo grupo estaban distribuyendo los bostezos a través de las 24 hrs. de un modo similar, se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman (6). Se encontró que, exceptuando el grupo 1, la hipótesis nula que establecía esta similaridad se rechazó en todos los casos, es decir los animales que formaban un mismo grupo no parecían seguir patrones de comportamiento muy parecidos.

Para el análisis de estos experimentos se emplearon las técnicas de análisis de datos circulares de una manera diferente. De cada animal se escogió la hora que presentaba la frecuencia más alta y el valor en el tiempo, del punto

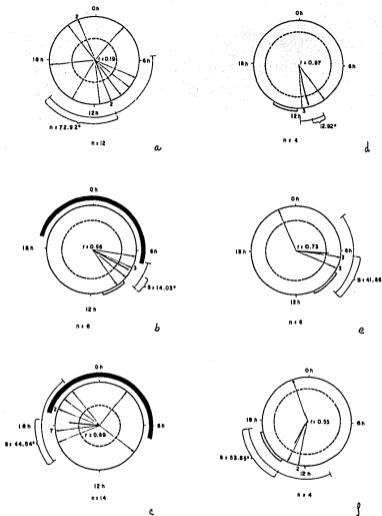
medio de este intervalo, se convirtió en ángulo. Con un sólo vector proveniente de cada animal y utilizando a todos los animales que recibieron el mismo tratamiento se calculó el vector de la dirección media y su desviación angular. También se aplicó la prueba de hipótesis de Rayleigh para probar si existían evidencias estadísticas de direccionalidad bajo cada uno de los tratamientos (3) (ver apéndice).

En muestras unimodales, la longitud del vector medio es una medida de concentración. En la medida que los vectores de la muestra apunten en direcciones divergentes, r decrecerá de 1 a 0.

Los animales que recibieron iluminación continua y alimentación ad libitum localizaron su frecuencia de bostezos más alta en distintos horarios, lo cual se refleja en vectores que apuntan en direcciones muy diferentes. Por lo tanto, la longitud del vector medio ($r = 0.19$) es muy pequeña y su desviación angular ($s = 72.92$) es grande (gráfica 1a).

El resultado de la prueba de Rayleigh indica que la muestra no aporta evidencias suficientes para suponer que la población de la cual proviene no tiene una distribución uniforme. Dicho de otro modo, no hay evidencia estadística de direccionalidad.

Los animales del grupo 5, condicionados a iluminación continua y alimentación restringida en un intervalo de dos horas (12.00 - 14.00), tienen una clara



Gráfica 1 Direccionalidad de las horas con máxima frecuencia de bostezos; (a) LL - ad libitum; (b) LD - restringida; (c) LD - ad libitum; (d,e,f) LL - restringida. Los semi círculos blancos indican los periodos de alimentación y los negros los periodos de oscuridad.

direccionalidad en los horarios de mayor incidencia de bostezos. El vector medio es grande ($r = 0.97$) y hay poca dispersión ($s = 12.92$). Su dirección apunta hacia las 11.00 anticipándose a la comida. La prueba de Rayleigh confirma lo anterior (gráfica 1d).

Con el grupo 4, que fue sometido a un periodo de alimentación de 2 horas y 30 minutos, se obtienen resultados equivalentes. La dirección del vector medio, hacia las 6.24, se anticipa al horario de alimentación. Sin embargo, los horarios de mayor bostezo están menos concentrados ($r = 0.73$, $s = 41.86$) (gráfica 1e).

Esta tendencia se acentúa en el grupo 6 cuyo periodo de alimentación se prolongó a tres horas. De hecho, no hay evidencias estadísticas para suponer que existe direccionalidad. Al parecer, los animales logran sincronizar mejor sus ritmos circadianos con un régimen alimenticio más corto (gráfica 1f).

En este sentido, los resultados del grupo 7 son muy interesantes. Hay una fuerte direccionalidad ($r = 0.96$, $s = 14.05$) que apunta hacia las 7.48 en animales que fueron sometidos a un ciclo de luz / oscuridad y alimentación entre las 9.00 y 11.00. Es decir, animales que estuvieron bajo el influjo de ambos sincronizadores, coordinaron sus ritmos sólo con la disponibilidad alimenticia (gráfica 1b).

Lo anterior señala la fuerza de uno de los sincronizadores respecto al otro, pero no puede cuestionar su existencia. En animales que estuvieron con alimentación

disponible durante todo el día y un ciclo de luz / oscuridad el vector de dirección media apunta hacia las 18.24 hrs., anticipándose al amanecer. Aunque la direccionalidad es menos pronunciada ($r = 0.69$, $s = 44.54$), es estadísticamente significativa (gráfica 1c).

Los resultados anteriores evidenciaron una gran variabilidad en la conducta, lo cual aunado a las restricciones impuestas por el diseño experimental utilizado complicaba el análisis estadístico de la información y no permitían describir adecuadamente el ciclo circadiano.

Se decidió planear un nuevo diseño experimental y utilizar el método logía estadística que permitiera estudiar mejor el ciclo con la finalidad de confirmar la existencia de un sistema inductor en la conducta y validar los resultados de los experimentos exploratorios.

OBJETIVO E HIPOTESIS

El objetivo de este trabajo es conocer si la alimentación es un sincronizador del ritmo diario de bostezos utilizando un diseño experimental diferente al empleado en los experimentos preliminares ya descritos.

Adicionalmente se intenta validar los resultados de los experimentos anteriores.

La hipótesis que está bajo estudio es la siguiente : si la alimentación es un sincronizador del bostezo podriamos esperar que los animales mantenidos bajo condiciones de iluminación constante y alimentación ad libitum presentaran un ritmo desorganizado. En cambio, en animales condicionados a un régimen de alimentación restringida y a horario fijo el patrón de frecuencias de bostezos debería caracterizarse por frecuencias altas en las horas previas a la disponibilidad alimenticia.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Se utilizaron seis ratas machos, adultos de dos meses de edad, al inicio del experimento, de la generación F16 de una cepa altamente bostezadora, seleccionada genéticamente en la U.A.P. a partir de la línea Sprague Dawley (20). Los animales fueron mantenidos en grupos de tres, en cajas de acrílico transparente (47 x 43 x 20 cm.) acojinadas con una capa de virutas y cubiertas por una tapa de alambre con depresiones para servir el alimento y el agua.

Los animales estuvieron en una habitación de 18 m². continuamente iluminada con dos tubos fluorescentes de 2.20 m. de longitud y 80 watts, situados a 2.5 m. de altura. El cuarto no estaba aislado del ruido provocado por el tránsito del personal entre las 9.00 y las 19.00 hrs., aunque el silencio fue recomendado. La temperatura fluctuó entre los 26 - 28 c.

Se utilizó un diseño experimental balanceado respecto a los efectos residuales, donde los seis animales recibieron aleatoriamente el orden en que les serían aplicados los dos tratamientos bajo iluminación continua:

- 1) alimentación ad libitum.
- 2) alimentación restringida entre las 12.00 y las 14.00 hrs.

El siguiente cuadro esquematiza el experimento.

Animales	Fase 1	Fase 2
1,5,6	luz constante ad libitum (18 días)	luz constante comida 12 - 14 hrs. (22 días)
registro	60 hrs.	52 hrs.
2,3,4	luz constante comida 12 - 14 hrs. (18 días)	luz constante ad libitum (22 días)
registro	60 hrs.	52 hrs.

La aplicación de ambos tratamientos a cada animal era necesario debido a la gran variabilidad de la conducta que queríamos estudiar, al tamaño reducido de la muestra disponible y al conocimiento de que la información genética es uno de los factores que determina el comportamiento de los ritmos circadianos.

Un grupo de animales recibió alimentación durante todo el día (ad libitum), mientras el otro fue alimentado entre las 12.00 y las 14.00 hrs. de cada día. Este horario fue seleccionado para evitar la confusión de los efectos de la comida con la posible persistencia del ritmo anterior. Ambos grupos de animales recibieron agua ad libitum.

La dieta consistió en alimento Purina para roedores de laboratorio. A las ratas con alimentación restringida, el alimento se les colocó directamente sobre la capa de virutas de la jaula, removiendo el exceso de comida a las 14.00 hrs. Durante el periodo de adaptación las ratas fueron pesadas, en varias ocasiones, antes y después de comer para estimar su tasa de ingesta.

Tras un periodo de acondicionamiento de 18 días los animales fueron observados durante 60 horas seguidas, iniciando a las 8.00 hrs. con la intención de registrar en tres ocasiones la conducta anticipatoria al ofrecimiento de comida. Después los animales fueron sometidos al tratamiento inverso por un periodo de 22 días. Este periodo de entrenamiento se extendió con la intención de eliminar el ritmo de los animales 2, 3 y 4 que habían estado sometidos a un régimen de alimentación restringida. A partir de los experimentos preliminares se podía esperar que la ruptura del ritmo sincronizado con el horario de alimentación requiriera más tiempo que el ritmo sincronizado con la luz. Al término del acondicionamiento se les observó por 52 horas consecutivas. Las observaciones no se prolongaron hasta las 60 horas porque la información de las ocho horas restantes, obtenida durante el primer periodo, no parecía justificar el esfuerzo humano del equipo involucrado en este trabajo.

Las observaciones fueron realizadas por dos personas entrenadas, situadas frente a frente, en sesiones de dos

horas, al término de las cuales eran relevadas por otra pareja de observadores.

METODOLOGIA ESTADISTICA

El registro del número de bostezos / hora de cada animal, bajo cada tratamiento, fue analizado utilizando técnicas de series de tiempo con el paquete Systat (Statistical Package for Statisticians).

Para describir la evolución de la conducta, a través del tiempo, se obtuvieron las autocorrelaciones y las autocorrelaciones parciales y se estimaron los modelos ARIMA (Modelos Autorregresivos y de Promedios Móviles) que representaban el comportamiento de cada serie (4).

Como un enfoque complementario para encontrar las periodicidades se utilizó el análisis espectral. Con el análisis de Fourier las series de tiempo se descomponen en una suma de componentes trigonométricos que pueden representarse a través del periodograma, el cual grafica el cuadrado de la magnitud de estos componentes contra sus frecuencias. Para agilizar los cálculos numéricos, Systat ha implementado un algoritmo que trabaja con series cuyas longitudes son múltiplos de dos. Para ello se transformaron las series de 60 y 52 observaciones en series de 64 observaciones, completándolas con ceros y removiendo la media de la serie.

Con el objetivo de describir gráficamente las semejanzas entre las series provenientes de animales sometidos al mismo tratamiento, utilizamos el análisis de conglomerados empleando el método de encadenamiento simple.

Con los estimadores de las funciones de densidad espectral estandarizadas, de modo que $\sum \hat{f}(\lambda_i) = 1$, se utilizó la medida de divergencia dirigida de Kullback - Leibler (13) para estimar las disimilaridades entre los distintos espectros como:

$$D = \int_{\pi} (f_1(x) - f_2(x)) \ln \frac{f_1(x)}{f_2(x)} dx$$

y, muestralmente como:

$$D = \sum_{\pi} (\hat{f}_1(x) - \hat{f}_2(x)) \ln \frac{\hat{f}_1(x)}{\hat{f}_2(x)}$$

donde $\hat{f}_1(x)$ y $\hat{f}_2(x)$ son las funciones de densidad espectral de las series cuya similaridad se está evaluando.

Con las disimilaridades se construyó una matriz que fue sometida al análisis de conglomerados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como las series reflejaban un fenómeno con varianza constante y sin tendencia no se hicieron transformaciones a la variable de respuesta. Exceptuando las series que presentaban una estacionalidad marcada, se consideró que la serie original era estacionaria.

Primera Fase

a) Alimentación ad libitum

Los animales mantenidos con alimentación ad libitum (1,5,6) exhibieron una aparente desorganización del ritmo circadiano de bostezos, caracterizado por la presencia de varios picos en la frecuencia de bostezos repartidos en diferentes horas del día (gráfica 2a).

El animal 5 presentó cierta periodicidad con incrementos en la frecuencia de bostezos en horas cercanas al anochecer, lo cual puede estar indicando rezagos del ritmo anterior debido a la alternancia de luz / oscuridad.

En los correlogramas de las series no se puede detectar un patrón definido (gráficas 3a,c,e). Para los animales 1 y 5 las únicas autocorrelaciones ligeramente significativas son para los periodos de 7 y 6 horas respectivamente, ciclos que posiblemente estén reflejando la manifestación de ritmos ultradianos. Estos ritmos tienen periodicidades de alrededor de siete horas y son más evidentes cuando se logra desorganizar a los ritmos

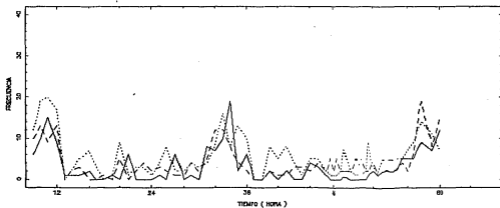
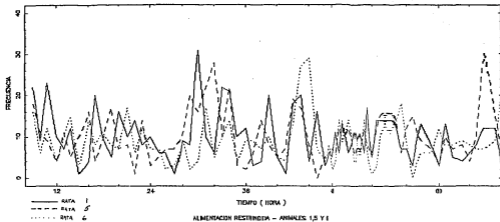
circadianos. Otra explicación posible se debe al azar, ya que en un conjunto de intervalos de confianza al 95% se espera que de 20 casos 1 no pertenezca al intervalo. El correlograma correspondiente a la rata 6 no presenta ninguna autocorrelación significativa.

Las autocorrelaciones parciales confirman estas observaciones (gráficas 3b,d,f). Las autocorrelaciones parciales significativas para los periodos 17 y 26 de la rata 5 podrían señalar desfases del ritmo circadiano y el inicio de su ruptura, aunque también es posible que estos resultados se deban al azar.

Con base en estos resultados se consideró que la serie original, para estos tres animales, era de ruido blanco.

Los espectros de frecuencia también muestran una conducta desordenada (gráficas 5a,6a,7a). Para estos tres animales existe una variación cíclica con un periodo cercano a 10 hrs. Existen algunos otros periodos asociados con concentraciones altas de frecuencia, de 2, 5 y 7 hrs.

ALIMENTACION AD LIBITUM - ANIALES 1,5 Y 6



PAGE 01
 NUMBER OF CASES = 60
 NAME OF SERIES = 5,100
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0,176

PLT OF AUTOCORRELATIONS

LAS	CON	SE	+1,0	+0,8	+0,6	+0,4	+0,2	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
1	1,047	1,070											
2	1,046	1,070											
3	1,045	1,070											
4	1,044	1,070											
5	1,043	1,070											
6	1,042	1,070											
7	1,041	1,070											
8	1,040	1,070											
9	1,039	1,070											
10	1,038	1,070											
11	1,037	1,070											
12	1,036	1,070											
13	1,035	1,070											
14	1,034	1,070											
15	1,033	1,070											
16	1,032	1,070											
17	1,031	1,070											
18	1,030	1,070											
19	1,029	1,070											
20	1,028	1,070											
21	1,027	1,070											
22	1,026	1,070											
23	1,025	1,070											
24	1,024	1,070											
25	1,023	1,070											
26	1,022	1,070											
27	1,021	1,070											
28	1,020	1,070											
29	1,019	1,070											
30	1,018	1,070											

a

PAGE 02
 NUMBER OF CASES = 60
 NAME OF SERIES = 5,100
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0,176

PLT OF PARTIAL AUTOCORRELATIONS

LAS	CON	SE	+1,0	+0,8	+0,6	+0,4	+0,2	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
1	1,047	1,070											
2	1,046	1,070											
3	1,045	1,070											
4	1,044	1,070											
5	1,043	1,070											
6	1,042	1,070											
7	1,041	1,070											
8	1,040	1,070											
9	1,039	1,070											
10	1,038	1,070											
11	1,037	1,070											
12	1,036	1,070											
13	1,035	1,070											
14	1,034	1,070											
15	1,033	1,070											
16	1,032	1,070											
17	1,031	1,070											
18	1,030	1,070											
19	1,029	1,070											
20	1,028	1,070											
21	1,027	1,070											
22	1,026	1,070											
23	1,025	1,070											
24	1,024	1,070											
25	1,023	1,070											
26	1,022	1,070											
27	1,021	1,070											
28	1,020	1,070											
29	1,019	1,070											
30	1,018	1,070											

b

PAGE 03
 NUMBER OF CASES = 60
 NAME OF SERIES = 5,100
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0,177

PLT OF AUTOCORRELATIONS

LAS	CON	SE	+1,0	+0,8	+0,6	+0,4	+0,2	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
1	1,077	1,070											
2	1,076	1,070											
3	1,075	1,070											
4	1,074	1,070											
5	1,073	1,070											
6	1,072	1,070											
7	1,071	1,070											
8	1,070	1,070											
9	1,069	1,070											
10	1,068	1,070											
11	1,067	1,070											
12	1,066	1,070											
13	1,065	1,070											
14	1,064	1,070											
15	1,063	1,070											
16	1,062	1,070											
17	1,061	1,070											
18	1,060	1,070											
19	1,059	1,070											
20	1,058	1,070											
21	1,057	1,070											
22	1,056	1,070											
23	1,055	1,070											
24	1,054	1,070											
25	1,053	1,070											
26	1,052	1,070											
27	1,051	1,070											
28	1,050	1,070											
29	1,049	1,070											
30	1,048	1,070											

c

PAGE 04
 NUMBER OF CASES = 60
 NAME OF SERIES = 5,100
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0,177

PLT OF PARTIAL AUTOCORRELATIONS

LAS	CON	SE	+1,0	+0,8	+0,6	+0,4	+0,2	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
1	1,077	1,070											
2	1,076	1,070											
3	1,075	1,070											
4	1,074	1,070											
5	1,073	1,070											
6	1,072	1,070											
7	1,071	1,070											
8	1,070	1,070											
9	1,069	1,070											
10	1,068	1,070											
11	1,067	1,070											
12	1,066	1,070											
13	1,065	1,070											
14	1,064	1,070											
15	1,063	1,070											
16	1,062	1,070											
17	1,061	1,070											
18	1,060	1,070											
19	1,059	1,070											
20	1,058	1,070											
21	1,057	1,070											
22	1,056	1,070											
23	1,055	1,070											
24	1,054	1,070											
25	1,053	1,070											
26	1,052	1,070											
27	1,051	1,070											
28	1,050	1,070											
29	1,049	1,070											
30	1,048	1,070											

d

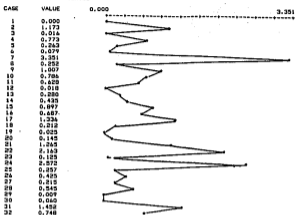
PAGE 05
 NUMBER OF CASES = 60
 NAME OF SERIES = 5,100
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0,176

PLT OF AUTOCORRELATIONS

LAS	CON	SE	+1,0	+0,8	+0,6	+0,4	+0,2	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
1	1,171	1,070											
2	1,170	1,070											
3	1,169	1,070											
4	1,168	1,070											
5	1,167	1,070											
6	1,166	1,070											
7	1,165	1,070											
8	1,164	1,070											
9	1,163	1,070											
10	1,162	1,070											
11	1,161	1,070											
12	1,160	1,070											
13	1,159	1,070											
14	1,158	1,070											
15	1,157	1,070											
16	1,156	1,070											
17	1,155	1,070											
18	1,154	1,070											
19	1,153	1,070											
20	1,152	1,070											
21	1,151	1,070											
22	1,150	1,070											

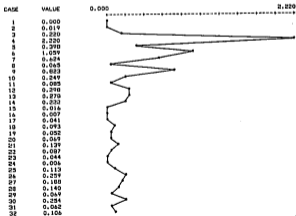
PLOT OF 01
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.698
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.778

SEQUENCE PLOT OF SERIES



PLOT OF 001
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.360
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.423

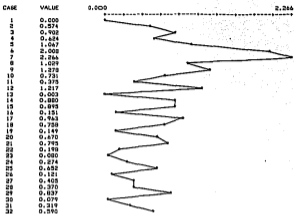
SEQUENCE PLOT OF SERIES



Gráfica 5 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 1; (a) alimentación ad libitum; (b) alimentación restringida.

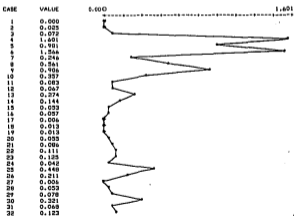
PLOT OF \hat{f}_n
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.364
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.524

SEQUENCE PLOT OF SECA 103



PLOT OF \hat{f}_n
 NUMBER OF CASES = 32
 MEAN OF SERIES = 0.276
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.411

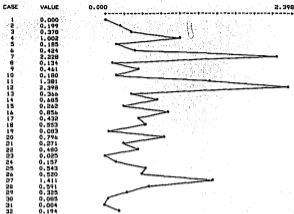
SEQUENCE PLOT OF SEPR 103



Gráfica 6 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 5; (a) alimentación ad libitum; (b) alimentación restringida.

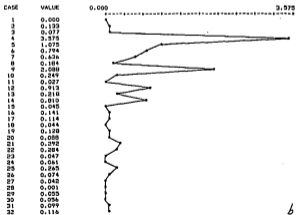
PLOT OF B_6
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.550
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.373

SEQUENCE PLOT OF SERIES



PLOT OF B_6
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.308
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.713

SEQUENCE PLOT OF SERIES



Gráfica 7 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 6; (a) alimentación ad libitum; (b) alimentación restringida.

b) Alimentación restringida

Los animales condicionados a un esquema de alimentación restringida (2,3,4) presentan una clara elevación del número de bostezos en horas previas a la disponibilidad de alimento (gráfica 8a).

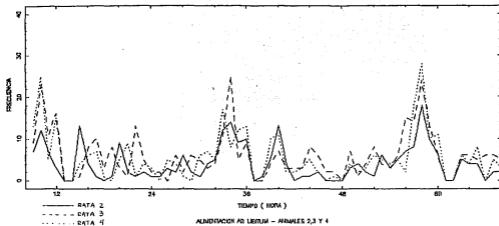
En los correlogramas (gráficas 9a,c,e) las autocorrelaciones más significativas son de primer orden, lo cual está indicando una fuerte dependencia de la frecuencia de bostezos observada en una hora, respecto de la conducta en la hora previa y la siguiente. La autocorrelación para el periodo de 24 horas es también significativa en las series de los animales 2 y 3. Si bien la autocorrelación para este periodo en la rata 4 no es significativa a un 95 % de confianza, es la segunda en magnitud y se encuentra en los límites del intervalo de confianza. En los tres casos, las autocorrelaciones no significativas forman el patrón sinusoidal que caracteriza a las series estacionales.

Las autocorrelaciones parciales para la rata 3 describen con claridad esta estacionalidad, no tanto así en los dos casos restantes (gráficas 9b,d,f).

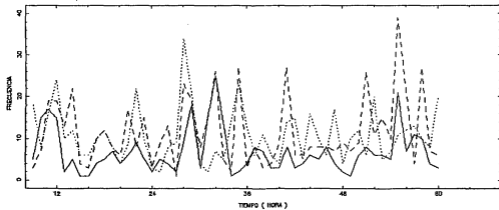
Sin embargo, en los periodogramas se observa un comportamiento común (gráficas 11a,12a,13a). Las máximas concentraciones de frecuencia están asociadas a un periodo de 20 hrs. Esta aparente discrepancia con el periodo de 24 hrs., detectado a través de la función de autocorrelación, se debe a un efecto del tamaño de la serie. Podemos considerar que el espectro observado es una aproximación del

espectro teórico y que se asemejará más a él en la medida que contemos con más información, es decir que registremos el fenómeno por un tiempo más prolongado. Si el interés es detectar el periodo de un ciclo bastaría que el tamaño de la serie fuera un múltiplo de ese periodo. Si esto no fuera posible por las características del paquete estadístico, la alternativa sería prolongar el número de observaciones. De este modo se reducirían los intervalos entre las frecuencias para las que se estimó el espectro y se lograría un acercamiento a la frecuencia que se desea detectar. El periodo de 24 horas puede manifestarse en los periodos de 20 y 30 horas muestreados. Apoyados en los resultados obtenidos en las autocorrelaciones podemos afirmar que el pico que presenta el espectro estimado, asociado al periodo de 20 hrs., a partir de la serie de 60 observaciones, es consecuencia del de 24 hrs. que no pudimos observar.

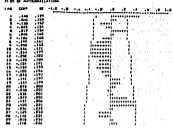
ALIMENTACION RESTRIENDA - ANIMALES 2,3 Y 4



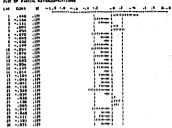
ALIMENTACION AD LIBITUM - ANIMALES 2,3 Y 4



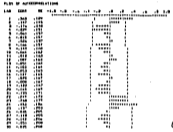
PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



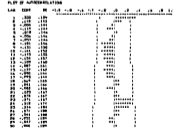
PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



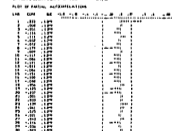
PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



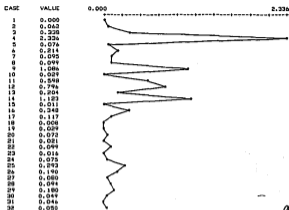
PLOT OF ρ_{11} VS ρ_{12}
 NUMBER OF CORRS = 40
 MEAN OF SERIES = 4.120
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.120



Gráfica 9 (a,c,e) Autocorrelaciones y (b,d,f) Autocorrelaciones Parciales de los animales 2,3 y 4, sometidos a alimentación restringida como primer tratamiento.

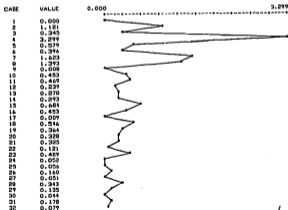
PLOT OF 32
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.276
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.468

SEQUENCE PLOT OF SERIES



PLOT OF 32
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.467
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.432

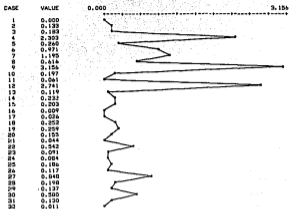
SEQUENCE PLOT OF SERIES



Gráfica 11 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 2; (a) alimentación restringida; (b) alimentación ad libitum.

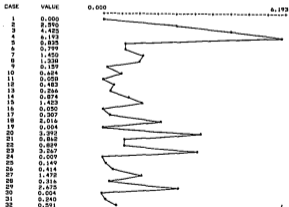
PLOT OF 83
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 0.509
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.776

SEQUENCE PLOT OF SERIES



PLOT OF 803
 NUMBER OF CASES = 64
 MEAN OF SERIES = 1.197
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 1.430

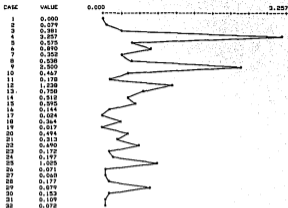
SEQUENCE PLOT OF SERIES



Gráfica 12 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 3; (a) alimentación restringida; (b) alimentación ad libitum.

PLOT OF B4
 NUMBER OF CASES = 44
 MEAN OF SERIES = 0.541
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.467

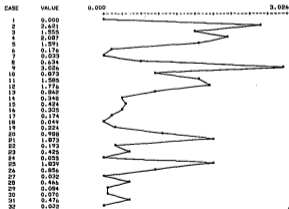
SEQUENCE PLOT OF SERIES



a

PLOT OF B44
 NUMBER OF CASES = 44
 MEAN OF SERIES = 0.913
 STANDARD DEVIATION OF SERIES = 0.623

SEQUENCE PLOT OF SERIES



b

Gráfica 13 Espectros de frecuencias estimados para las series de bostezos del animal 4; (a) alimentación restringida; (b) alimentación ad libitum.

Segunda Fase

a) Alimentación restringida

Los animales 1, 5 y 6 que recibieron una dieta restringida, como segundo tratamiento, sincronizaron su ritmo diario de bostezos con el horario de alimentación. Su conducta se caracterizó por un incremento en la frecuencia de bostezos en horas previas a la comida (gráfica 2b).

Sus correlogramas son semejantes a los de los animales 2, 3 y 4 de la sección anterior. La primera autocorrelación es la única significativa, seguida en magnitud por la de 24, y formando con las autocorrelaciones restantes un patrón sinusoidal (gráficas 4a,c,e). Las autocorrelaciones parciales confirman estos resultados (gráficas 4b,d,f).

En sus periodogramas la concentración de frecuencias más alta está asociada a un periodo de 17 hrs. Nuevamente podemos ver la gran influencia del tamaño de muestra, con una serie de 52 observaciones nos alejamos alrededor de 7 horas del periodo que tiene este ritmo. Existe también una periodicidad menor de 6 hrs. (gráficas 5b,6b,7b).

b) Alimentación ad libitum

Las ratas 2, 3 y 4, que estuvieron con iluminación continua y alimentadas ad libitum, presentaron desorganizaciones en sus ritmos, pero mantuvieron

frecuencias altas anticipatorias al horario de alimentación del tratamiento anterior (gráfica 8b).

El correlograma del animal 3 tiene un patrón irregular, ninguna autocorrelación es significativa y existen varias en los límites del intervalo de confianza, la 3, 8, 13 y 23 (gráfica 10c). De sus autocorrelaciones parciales la 23 es ligeramente significativa (gráfica 10d).

El correlograma del animal 4 refleja el mismo fenómeno, la autocorrelación 4 es significativa y las 2, 6 y 16, aunque no significativas, son altas respecto a las otras (gráfica 10e). Las autocorrelaciones parciales 2, 4 y 10 son significativas (gráfica 10f).

La rata 2 fue la que conservó con más fuerza el ritmo anterior. Su correlograma refleja un ritmo más desorganizado que bajo el primer tratamiento, pero guarda algunas semejanzas. La primera autocorrelación es significativa y las asociadas a periodos de 16, 21, 22 y 26 hrs. se acercan a los límites del intervalo de confianza (gráfica 10a).

Sus espectros de frecuencia confirman estos resultados (gráficas 11b, 12b, 13b).

En general, las series correspondientes a animales que recibieron alimentación restringida, como primer o segundo tratamiento, pueden describirse con un modelo MA1 estacional de periodo 24, ajustado después de realizar una diferencia estacional del mismo periodo. El modelo

identificado fue ARIMA (0,1,1)₂₄. Los estimadores del parámetro, así como la verificación de los supuestos del modelo, en cada una de las series, se presentan en el cuadro 2.

Para las series de los animales mantenidos con alimentación ad libitum no fue posible encontrar un modelo común, o al menos uno que se ajustara relativamente bien.

La diferencia entre los tratamientos aplicados, que se refleja en la diferencia de los modelos identificados, es aun más clara a través de los resultados del análisis de conglomerados. Como puede apreciarse en la gráfica 14, los espectros se agruparon en dos grandes grupos formados por animales que recibieron el mismo tratamiento, sin importar el orden de aplicación. No obstante, las series correspondientes a animales mantenidos con un régimen de alimentación restringida se reúnen, en un grupo compacto, con mayor rapidez que las series de animales alimentados libremente. El sincronizador, que en este caso es la alimentación, promueve respuestas semejantes en los animales, caracterizadas por la estimulación de la conducta del bostezo previa a la disponibilidad de alimento. Esto se refleja en el análisis de conglomerados con una detección más pronta de las similitudes entre las series. Con el tratamiento de alimentación ad libitum y luz continua, los animales desorganizan sus ritmos, por lo que sus conductas reflejan con más fuerza las condiciones fisiológicas de cada

ANIMAL	PARÁMETRO ESTIMADO	ANÁLISIS DE RESIDUALES							ANÁLISIS DEL MODELO		
		$\hat{\alpha}$ ($\hat{\alpha}$)	$\hat{\beta}$ ($\hat{\beta}$)	ASIMETRÍA	CURTOSIS	ABERRANTES ($\pm 3\hat{\sigma}$)	CORRELACIONES $\alpha \neq 0$	$W \cdot X_L - \lambda_{L-1}$	КОМПОЗИЦИЯ РЕЗИДУОВ $H_0: \text{Normal}$	INVERTIBILIDAD	CONFERENCIACIÓN
2	0.87 (± 0.05)	0.21	1.98	1.24	3.0	$\hat{\alpha}_{26} = 7.18$ 32	ninguna	-0.50	NO RECHAZO $\alpha = 0.59$	61	710
3	0.83 (± 0.06)	-0.06	2.32	-0.32	0.06	ninguno	"	-0.45	" $\alpha = 0.10$	"	"
4	0.86 (± 0.05)	-0.02	3.36	-2.02	8.71	$\hat{\alpha}_{26} = 14.72$	"	-0.51	" $\alpha = 0.13$	"	"
1	0.87 (± 0.12)	-0.17	2.45	0.55	3.51	$\hat{\alpha}_{26} = 7.69$	"	-0.35	" $\alpha = 0.33$	"	"
5	0.84 (± 0.06)	-0.30	3.03	-0.89	1.91	$\hat{\alpha}_{28} = 9.4$	"	-0.47	" $\alpha = 0.33$	"	"
6	0.85 (± 0.06)	-0.52	2.26	-0.43	0.75	ninguno	"	-0.42	SE RECHAZA $\alpha = 0.04$	"	"

Cuadro 2: Diagnóstico del modelo (0,1,1)₂₄ ajustado a las series correspondientes a los animales sometidos a alimentación restringida.



Gráfica 14 Análisis de Conglomerados de los espectros de frecuencias estimados; (B) primer tratamiento; (BB) segundo tratamiento; los números junto a las letras identifican a los animales.

individuo. Es por ello que el análisis de conglomerados detecta este grupo con posterioridad.

En diseños experimentales donde los tratamientos se aplican secuencialmente a un mismo sujeto es posible que se presenten, como en nuestro caso, efectos residuales de un tratamiento en los periodos siguientes. El periodo de acondicionamiento de 22 días, al que se sometió a los animales después del primer tratamiento, no fue suficiente para evitarlos.

En algunas situaciones como ésta, es posible analizar los resultados de manera que las medias de los tratamientos se ajusten por los efectos residuales. En nuestro caso, habría sido necesario analizar los resultados con la técnica de análisis de perfiles. Sin embargo, se consideró que no era la vía más adecuada puesto que nuestro interés básico era describir la configuración de la conducta del bostezo a través del tiempo y las técnicas de series de tiempo son muy útiles en este sentido.

CONCLUSIONES

- El bostezo, en la rata, es una conducta con expresión rítmica circadiana, sincronizada con los ritmos de iluminación e ingesta de alimento.

- En condiciones de iluminación continua e ingesta libre de alimento el ritmo del bostezo se desorganiza.

- Bajo iluminación continua y alimentación restringida, a horario fijo, la conducta del bostezo se manifiesta a su más alta frecuencia en horas previas a la administración de alimento.

- En condiciones de alimentación restringida y ciclos de luz / oscuridad de 12 / 12 hrs., el ritmo circadiano se sincroniza con la alimentación.

- Dada la gran variabilidad individual que presenta esta conducta, el estudio de su patrón temporal requiere de un diseño experimental en el que cada animal sea su propio control y la actividad sea monitoreada continuamente por lo menos durante 48 horas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anías, J., Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Eguibar, J.R. 1984. Circadian Variations of Yawning Behavior. *Acta Neurobiol. Exp.* 44:179-186.
- 2.- Baenninger, R. 1987. Some Comparative Aspects of Yawning in *Betta splendens*, *Homo sapiens*, *Panthera leo* and *Papio sphinx*. *Journal of Comparative Psychology* 101(4):349-354.
- 3.- Batschelet, E. 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press Inc., London, pp 3-128.
- 4.- Chatfield, C. 1978. *The Analysis of Time Series: Theory and Practice*. Chapman and Hall, London.
- 5.- Cochran, W.G., Cox, G.M. 1957. *Experimental Designs*. John Wiley and Sons, Inc. Second Edition, U.S.A., pp 133-143.
- 6.- Conover, .J. 1971. *Practical Nonparametric Statistics*. Wiley, New York and London.
- 7.- Garfield, E. 1988. *Chronobiology: An Internal Clock for All Seasons. Part I. The Development of the Science of Biological Rhythms. Current Comments in Current Contents, Number 1, pp 3-8.*

- 8.- Gross, G.A. 1983. Circadian Rhythms and the Circadian System. *Adv. Biol. Psychiat.* 11:1-9.
- 9.- Hadidian, J. 1980. Yawning in an Old World Monkey, *Macaca nigra* (Primates:Cercopithecidae). *Behavior* 75:133-147.
- 10.- Hall, J.C., Rosbash, M. 1987. Genes and Biological Rhythms. *Trends in Genetics* 3(7):185-191.
- 11.- Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Rodriguez, R. 1980. Génesis y Regulación del Bostezo. *Rev. Hosp. Psiquiatr. La Habana XXI*(3):369-380.
- 12.- Hotz, M.M., Connolly, M.S., Becker Lynch C. 1987. Adaptation to Daily Meal-Timing and Its Effect on Circadian Temperature Rhythms in Two Inbred Strains of Mice. *Behavior Genetics* 17(1):37-51.
- 13.- Kullback, S. 1968. *Information Theory and Statistics*. Dover Publications, Inc., New York, pp 12-31.
- 14.- Méndez, I. 1976. Lineamientos generales para la planeación de experimentos. *Comunicaciones Técnicas, Serie General* 3(15), CIMAS-UNAM, México.
- 15.- Méndez, I. 1983. Comentarios sobre el diseño y análisis de experimentos con animales. *Comunicaciones Técnicas, Serie Azul* No 67, IIMAS-UNAM, México.

- 16.- Possidente, B., Hegmann, J.P., Elder, B., Carlson, L. 1980. Dissociation of circadian rhythms for food and water consumption in mice. *Physiol. Behav.* 25(2):279-281.
- 17.- Possidente, B., Hegmann, J.P. 1980. Circadian Complexes: Circadian Rhythms Under Common Gene Control. *J. Comp. Physiol.* 139:121-125.
- 18.- Provine, R.R. 1986. Yawning as a Stereotyped Action Pattern and Releasing Stimulus. *Ethology* 72:109-122.
- 19.- Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Holagren, B., Equibar, J.R., Gavito, A., Cruz, G., Santos, A. 1988. Genotypic Variation in Spontaneous Yawning Behavior in the Rat. (enviado a publicación en *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*)
- 20.- Wirz - Justice, A. 1987. Circadian Rhythms in Mammalian Neurotransmitter Receptors. *Progress in Neurobiology.* Vol 29:219-259.