



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estrès i activimetria per a l'estudi del ritme son- vigília en cavalls (*Equus caballus*)

Malena Coll Jiménez

Grau de biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43165232-M

Treball tutelat per Maria Cristina Nicolau Llobera

Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Biological Rhythms, Stress, Sleep, Horse

Resum

El ritme biològic es pot definir com una oscil·lació específica que presenta l'individu que es repeteix cada 24 hores. Els ritmes circadianis son establerts pel rellotge biològic localitzat en el nucli supraquiasmàtic (NSQ) de l'hipotàlem, tot i ser així pot ser alterat per males costums en l'estil de vida. L'estrès es pot definir com un conjunt de reaccions específiques de l'organisme davant diferents agents nocius de l'ambient. Aquests agents nocius tenen la capacitat d'alterar l'equilibri del ritme biològic quotidià. Les alteracions en els ritmes poden alterar processos fisiològics com son el son. La importància d'aquesta etapa i la importància de la funció que te en l'organisme es vital.

L'objectiu de l'estudi va ser estudiar els cicles biològics dels cavalls i com es modifiquen davant alteracions en les seves vides quotidianes. Es varen realitzar dues proves diferents. La primera prova va constar amb un total de 4 subjectes als quals sels va mesurar l'activitat en tres períodes: basal, estrès i recuperació. El període de estrès va ser creat per un canvi d'hàbitat. La durada total d'aquesta prova es de cinc setmanes. La segona prova va ser realitzada a dos subjectes. Amb una durada de 9 dies, va consistir en mesurar a l'igual que en la prova anterior l'activitat durant un període control, un d'estrès i un de recuperació. Però en aquest cas l'estrès va ser creat per 10 alarmes nocturnes repartides entre les 23:00 i les 06:00 de la matinada.

Els resultats finals discutits en aquest treball ens mostren que no hi ha cap tipus de correlació entre les hores de foscor-llum i l'activitat dels animals. Aquest desajust agafa concordança quan comparem els nostres resultats amb altres d'animals presa, els quals tenen un son molt fraccionat amb abundants períodes de vigília. En la majoria d'animals l'estrès determina reduccions en la quantitat i l'eficiència del son. La generalitat dels animals mostren tres tipus de resposta davant una situació de perill: atac, fugida o immobilitat. Les reduccions en l'activitat registrades davant d'una situació estressant no poden ser interpretades com augment en la producció de son. Es sabut que la particular estructura anatòmica de les potes del cavall permeten el manteniment d'una postura erecta sense necessitat d'activitat muscular. Es probable que la suposada correlació entre una reduïda activitat i el son poligràfic sigui un problema de importància en el present estudi.

Abstract

The biological rhythm can be defined as a specific swing that presents an individual that is repeated every 24 hours. Circadian rhythms are set by the biological clock located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, although it may well be altered by bad habits in lifestyle. Stress can be defined as a set of specific reactions of the organism to various harmful agents in the environment. These harmful agents have the ability to alter the balance of the daily biological rhythm. Alterations in rhythms can alter physiological processes such as sleep. The importance of this period and the importance of its role in the body are vital.

The aim of the study was to study the biological cycles of horses and how changed front changes in their daily lives. Two different tests were made. The first test was 4 subjects, and was measured activity in three periods: basal, stress and recovery. The stress period was created by a change of habitat. The total duration of this test is five weeks. The second test was performed in two subjects. It lasted 9 days, consisted of measuring the same as in the previous test: activity during a control period, a stress and recovery. But in this case the stress was created by 10 nocturnal alarms divided between 23:00 and 06:00 am.

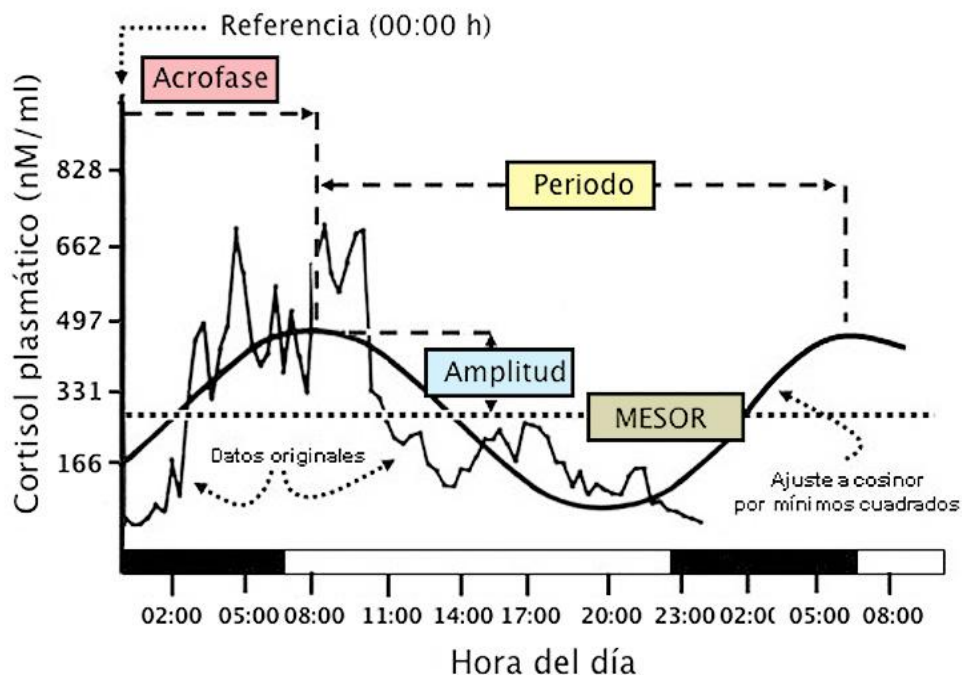
The final results discussed in this paper show that there isn't correlation between the activity and the hours of darkness or hours of daylight. This result is consistent with the results of other animal's prey, which have a very divided sleep, and abundant periods of wakefulness. In most animal stress determines reductions in the amount and efficiency of sleep. Animals are three types of response to a dangerous situation: attack, escape or immobility. Reductions of activity recorded faced with a stressful situation cannot be interpreted as increased production of sleep. It is known that the particular anatomical structure of the horse's legs allows the maintenance of erect posture without muscle activity. It is probable that the supposed correlation between reduced activity and polygraph sleep is a problem in the present study.

Introducció:

Ritmes circadianis

Els ritmes biològics són una propietat intrínseca dels organismes vius que sorgeixen com a mecanismes d'adaptació als canvis que es donen cíclicament a l'entorn. Tot ritme biològic presenta una sèrie d'elements o variables que el defineixen (imatge. 1), són els següents:

- **Període**, interval de temps entre dos esdeveniments iguals, és a dir, és la duració d'un cycle complet
- **Mesor** (paraula composta de les inicials Midline Estimating Statistic Of Rhythm), és la mitjana de tots els valors observats durant un cycle, indica el rang en que la variable d'estudi oscil·la
- **Amplitud**, és la diferència entre el mesor i el valor màxim arribat durant un període, expressa la variació del fenomen d'estudi i és indicativa de la definició del ritme
- **Fase**, és el valor d'una variable en un moment donat, per caracteritzar la fase es determina l'**Acrofase** (cenit), moment en el que es presenta el valor màxim al llarg d'un període, permet identificar un avanç o un retràs en la freqüència del cycle o ritme.

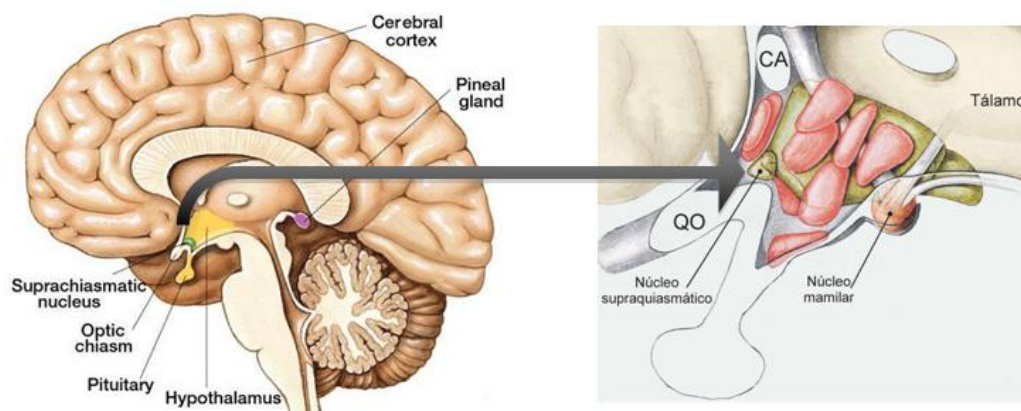


Imatge 1. Diagrama on es presenta el ritme biològic de la concentració plasmàtica de cortisol indicant com s'ajusta a una funció cosinoidal. Sobre la funció s'indiquen els paràmetres que defineixen els ritmes biològics: període, mesor, amplitud i acrofase. Modificat d'E. Haus i Touitou, 1994.

Una gran part de les nostres variables fisiològiques i comportamentals presenten ritmes d'aproximadament 24 hores. Aquests ritmes reben el nom de **ritmes circadianis**, i permeten a l'organisme adaptar-se en front a les alteracions diàries de l'entorn causades per la rotació terrestre (Moore-Ede, 1982). La manifestació més clara d'aquests ritmes circadianis és l'alternança del son i la vigília, que es fa coincidir amb la nit i el dia, respectivament. S'ha demostrat que alteracions en la sincronització dels ritmes repercuten en la salut (Hastings, 2003).

Aquests ritmes circadianis es generen per un marcador sensible a la llum localitzat en el nucli supraquiasmàtic (NSQ) de l'hipotàlem, que es pot considerar el rellotge biològic circadiani central del cervell dels mamífers (Klerman, 2001).

Els animals i els humans tenim un rellotge biològic intern responsable de mantenir l'ordre en els ritmes de alerta, temperatura i producció hormonal, provocant els coneguts ritmes circadianis. El ritme circadiani es pot definir per tant, com una oscil·lació específica que pateix l'individu que es repeteix tots els dies, es a dir cada 24 hores.



Imatge 2. Nucli supraquiasmàtic, situat a l'hipotàlem anterior.

Els sincronitzadors externs ajusten el rellotge intern als cicles geofísics de 24 i reforcen la sincronització interna de tots els ritmes de l'organisme. El sincronitzador més important del ritme circadiani és la alternança de llum i obscuritat cada 24 hores. Les oscil·lacions de temperatura corporal i el son estan estretament correlacionats, la temperatura presenta un màxim després de la meitat de la part il·luminada del cicle i un mínim durant la fase obscura.

Els ritmes circadianis són establerts pel rellotge biològic, tot i així poden ser alterats per males costums en l'estil de vida, com per exemple alts nivells d'estrès, llum, televisors, ordinadors, etc. L'alteració de la son pot fer perdre la qualitat i capacitat de recuperació física.

Estrès

El concepte d'estrès va ser introduït per Hans Selye el 1935 i el va definir com a síndrome o conjunt de reaccions específiques de l'organisme a diferents agents nocius de l'ambient. Aquest fenomen es presenta en moments en els que la vida presenta dificultats. L'estrès es una resposta del cos a condicions externes que alteren l'equilibri. El resultat d'aquest procés es un desig de fugir de la situació que el provoca o de enfrontar-se violentament, on participen tots els òrgans i funcions del cos, cervell, sistema nerviós, cor, flux sanguini, nivells hormonal, digestió y funció muscular.

El son

El son es un estat biològic present en animals i en els éssers humans. Es un estat de consciència on cada espècie i cada edat mostra unes característiques i quantitats de son diferents. Però dintre de la varietat existent, el son pot ser clarament reconegut per l'aspecte extern de l'organisme dormit. En una primera aproximació, el son podria ser definit com l'absència de comportament. El son presenta un seguit de característiques que defineixen aquesta etapa de "no comportament": repòs motor, llindars sensorials elevats, reversibilitat, posició corporal estereotipada, recurrència circadiària i llocs específics per dormir. Tots aquests aspectes es troben regulats, i aquesta coordinació ressalta la importància d'aquesta etapa i la importància de la funció que te en l'organisme, tant com ho es la ingesta.

Per aprofundir mes amb les característiques d'aquest estat s'utilitzen mitjans de registre gràfic, amb els quals es poden reconèixer els canvis que intervenen a l'organisme quan es dorm. Per poder descriure tots els processos que s'observen a un individu dormit es precis comparar-los primer durant el moment de vigília.

Cavalls

Les diferents conductes dels cavalls es van repetint amb una certa freqüència. El seu organisme disposa de estructures regulades per els factors ambientals que mantenen la periodicitat del seu comportament. Entre aquests factors, la llum juga un paper fonamental. Com a la resta dels animals, els cavalls tenen ritmes d'activitat i repòs sota controls interns (els rellotges interns) i externs, sobre tot la llum, però també la temperatura, la pressió atmosfèrica, l'activitat física, els senyals socials, els sorolls, etc. La resposta del rellotge intern depèn de l'activitat del nucli supraquiasmàtic del hipotàlem i de la secreció nocturna de la melatonina secretada per la glàndula pineal. L'activitat d'aquesta glàndula no tant sols serveix de rellotge, si no també de calendari que serveix, per exemple, per controlar l'arribada del zel en una determinada època de l'any.

Malgrat que es una necessitat fisiològica per a tots els animals, el son per els cavalls presenta algunes característiques particulars. D'entrada, els cavalls, com la resta d'animals sotmesos a la depredació, dormen menys que els depredadors i generalment tenen suficient amb quatre hores. A més a més, normalment presenten molt poca quantitat de REM (Rapid Eye Movement o son paradoxal). Fins i tot, aquesta fase pot ser absent durant llargues temporades sense problemes observables. Finalment, el son dels cavalls es molt lleuger i mantenen els llindars sensorials baixos –sobretot els auditius- durant el son, per la qual cosa es poden despertar molt ràpidament.

L'articulació del genoll dels cavalls permet mantenir la posició dreta sense necessitat de realitzar cap esforç muscular. Per aquesta raó, els cavalls poden dormir durant el son NREM drets i només jeuen quan entren en el son REM en situacions en les quals se senten molt segurs.

Hipòtesi i Objectius

Donant aquests antecedents es va proposar analitzar el ritme circadiari d'activitat d'una mostra de cavalls baix condicions basals i estrès.

Per lo qual es proposen els següents objectius:

- Analitzar el ritme circadiari d'activitat d'una mostra de 4 cavalls en condicions basals.
- Analitzar el ritme circadiari d'activitat davant dues situacions estressants: canvi d'estable i aplicació de renou durant el període obscur.
- Analitzar el ritme circadiari d'activitat després d'haver patit una fase estressant, per veure la seva nova estabilització.
- Detecció de variacions en el cicles de son- vigília.

Materials i mètodes

L'estudi ha consistit en dues proves, ambdues amb la intenció de veure els canvis en els hàbits quotidians de son durant períodes d'estrès als cavalls:

Primer Experiment

Aquest estudi es va realitzar amb un grup de 4 cavalls de sexe masculí de diferents edats que varien entre els 15 i els 30 anys. Aquest estudi va tenir una durada de 5 setmanes per a cada

cavall. Durant aquest temps es va realitzar un registre dels ritmes circadianis d'activitat mitjançant els sensors d'activitat (HOBO® Pendant G; Massachusetts, Onset). Els sensors es col·locaven a una de les extremitats posteriors de l'animal amb l'ajuda de unes venes, les quals varen ser adaptades per poder subjectar el sensor de forma correcta. A més d'enregistrar els moviments, el sensor també podia enregistrar la posició corporal del cavall es a dir, emmagatzemava si estava dret o ajagut. Al mateix cop també es duia un registre de la intensitat llumínica mitjançant els sensors de llum (HOBO ligh® Pendant G; Massachusetts, Onset).

Cada cavall va ser controlat de si mateix, per la qual cosa se li va mesurar el seu cicle quotidià durant una setmana al seu habitatge habitual. Passada la setmana basal procedirem a traslladar als subjectes a un estable totalment desconegut per ell, el qual és una situació estressant per als cavalls. Es va procedir a mesurar durant quinze dies els canvis que es produïen en l'activitat durant aquestes dues setmanes. A continuació, es va procedir a retornar cada cavall amb el seu amo i al seu propi estable, i es varen seguir prenent dades durant dues setmanes més.



Imatge 3: En aquesta fotografia podem veure el cavall 2 anomenat Mowgli durant la fase de estrès, es trobava en un estable completament desconeguda. Podem veure el sensor de llum enganxat al cabestrell amb una brida. Per una altra part, podem veure a la extremitat anterior dreta com dur un embenatge en el qual du el sensor d'activitat.

Segon experiment

El segon estudi va ser realitzat durant un període de nou dies. Per aquesta prova només varen participar 2 cavalls. La prova consistia en mesurar l'activitat basal de cada subjecte com a l'experiment anterior durant un període de tres dies. Passats aquests dies de mesura basal s'instal·là a la seva establa un sistema amb capacitat per produir inesperadament un soroll estrident a intervals irregulars. El control del soroll va esser controlat per un programador digital setmanal Mod. TGE-2A. Simultàniament a la producció del soroll, s'encenia una llum fora de l'abast dels subjectes. La llum era percebuda per un sensor de llum que emmagatzemava la hora a la qual s'havia connectat l'estímul sonor. El sistema va ser programat per que s'encengui 10 cops durant el període de son dels animals (entre les 23:00 i les 6:00) amb una durada de 1 a 3 minuts.

Els cavalls varen esser sotmesos al soroll durant tres dies, passats els quals vàrem continuar amb la presa de mesures per detectar la variació o recuperació del seu ritme quotidià.



Imatge 4: En aquesta imatge es poden veure els dos altaveus, dirigits a l'interior de l'estable, just a sota dels altaveus podem veure el programador digital.

Com al primer experiment, es va mesurar els moviments de l'animal amb al mateix sensor que es va programar per emmagatzemar dades cada 30 segons en alguns casos i cada minut en altres. Aquests sensors foren embenats a l'extremitat posterior a la qual se li va aferrar un butxacó fet a la mida del sensor, per assegurar la seva correcta posició i per evitar que si el cavall arrenques la vena el sensor no es perdés.

Anàlisi de les dades

Per caracteritzar els ritmes d'activitat s'utilitzaren tests paramètrics i o paramètrics mitjançant el software CircadianwareTM. V7. 1. 1 (Campos 2010). L'anàlisi paramètric va consistir en l'anàlisi del cosinor i el test de Rayleigh. L'anàlisi del cosinus és un mètode molt emprat en els estudis de cronobiologia i que consisteix en determinar, pel mètode dels mínims establerts, la funció cosinoidal que millor descriu el ritme. Possibilita la determinació dels principals paràmetres rítmics: el mesor (valor mitjà de la variable estudiada), l'acrofase (hora del dia en que es registra el valor màxim) i l'amplitud (diferència entre el mesor i el valor màxim) (Díez-Noguera 2006; Haffen 2009; Portaluppi 2008; So 2007). La maduració del ritme s'avaluava utilitzant la constant de Reyleigh o estabilitat del ritme, que quantifica la similitud dels distints ritmes de 24 hores. Proporciona un vector que té el seu origen en el centre d'una circumferència de radi 1, a longitud del vector r (entre 0 i 1) proporcional al grau d'homogeneïtat de fase durant el període analitzat.

L'anàlisi no paramètric es va fer mitjançant el càlcul de l'índex de funció circadiària o CFI o índex d'ajust comparatiu de Bentler, descrit per Ortiz- Tudela et al. 2010, per a classificar als individus en funció de l'estatus de la seva funció circadiària. Aquest índex incorpora tres paràmetres: IV, variabilitat intradiària, que quantifica la fragmentació del ritme; IS, estabilitat interdiària, que quantifica la similitud entre els diferents cicles de 24h i RA, alternativament no paramètrica a l'amplitud calculada pel mètode del cosinor. El CFI oscil·la entre 0 i 1 els valors pròxims a 1 indiquen una major robustesa dels ritmes d'activitat, i valors pròxims a 0 indiquen un desajust elevat (Ortiz-Tudela et al. 2010)

Els resultats s'expressaran com a mitjana +- error estàndard de la mitja (SEM). L'anàlisi estadístic de les dades entre les mesures de temps diferents es durà a terme amb l'anàlisi de la variància ANOVA de model general lineal per mesures repetides.

Resultats

Es presenten els resultats en 5 apartats:

Resultats 1:

Experiment 1

El cavall 1 anomenat Whisky tenia una edat de 26 anys quan li vàrem realitzar la primera prova i una edat de 28 anys quan li vàrem realitzar la segona prova. Té una edat bastant avançada. La seva vida quotidiana consisteix en sortir a pasturar sobre les 6:00, té un espai immens on ell es pot moure lliurement i menjar tant com vulgui. Aquest cavall comparteix el lloc de pastura amb una guarda d'ovelles. Sobre les 18:00 es estabulat. El seu tancat consta de aproximadament 60 metres establerts el qual conte un estabul d'uns 6 metres establerts per resguardar-se.

Durant la setmana de estrès, aquest cavall va ser intercanviat d'hàbitat amb el cavall 2. Aquests 15 dies va ser estabulat dins un tancat de uns 60 metres establets. Sortia a pasturar mes tard del que ell estava acostumat, aproximadament sobre les 10 i era estabulat de nou sobre les 21 hores. A diferència del que tenia a casa seva, no pasturava cada dia al mateix lloc i havia dies que enlloc de estar lliure el fermàvem a llocs on havia molta d'herba.

El cavall 2 anomenat Mowgli, amb una edat de 16 anys vivia tancat a un espai de aproximadament 3000 metres establets on convivia amb una guarda de cabres. Dins aquest espai havia un porxo on es podien resguardar tant el cavall com les cabres. En cap moment era estabulat.

Durant la seva setmana de estrès, tal i com he comentat anteriorment, va ser canviat d'estable amb el cavall 1. El cavall 2 va ser estabulat al mateix lloc on residia el cavall 1 comentat anteriorment. A les 06:00 del matí sortia a pasturar amb una corda llarga. Cada dia era fermat a un lloc diferent. Era estabulat de nou sobre les 18:00.

El cavall 3 anomenat Universo tenia una edat de 20 anys quan li vàrem realitzar la primera prova i una edat de 21 anys quan li vàrem realitzar la segona prova. Aquest cavall viu estabulat les 24 hores del dia. El seu tancat consta d'un espai d'uns 50 metres establets en els quals la meitat estan coberts per poder refugiar-se en cas de pluja o per fugir del sol. Un pic per setmana aquest cavall surt de excursió, es muntat per passejar o simplement per no perdre les seves habilitats ja que va ser domat a l'alta escola.

El cavall 3 durant la seva quinzena de estrès també va ser portat a l'habitatge del cavall 1. Però en aquest cas, aquest cavall no va ser tret a pasturar ja que no sap estar fermat. I per desconfiança, no el deixaven lliure al terreny on habitualment pastura el cavall 1. Per tant, era alimentat sempre a l'estable un cop a les 06:00 i un segon cop a les 18:00. El seu amo va seguir amb la seva rutina habitual i el va treure algun cop a passejar i a entrenar.

El cavall 2 i el cavall 3 pertanyen a la mateixa finca on hi ha tot tipus de animals. Per tant ambdós, estan acostumats a conviure encara que no sigui de forma directe amb gallines, porcs, cabres, ovelles, conills, moixos i cans.

El cavall 4 anomenat Roig tenia una edat durant la prova de uns 30 anys. A l'igual que el cavall 1, té una edat bastant avançada. Aquest cavall està lliure dins un gran terreny, a pesar de tenir un estable només entra en els moments en el que l'amo li du menjar. Per tant aquest cavall pastura tot lo dia i pot menjar dia i nit tant com vol. A aquest cavall li agrada molt anar a la vora de dues eugues del veïnat.

Durant les dues setmanes de estrès va anar al tancat del cavall 3, abans mencionat. Durant el període que aquest cavall va viure fora de casa seva, sortia a pasturar cada dia de 10:00 a 20:00 hores aproximadament. I la resta del temps era estabulat.

A les figures 1-4 es representa el "double plot" de cadascun dels animals amb els resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiària amb les variables analitzades (mesor, acrofase, amplitud, CFI i contant de Rayleigh), durant els tres períodes de l'experiment 1: basal, estrès i recuperació (abans, durant i després de l'aplicació de l'element estressant, respectivament).

Experiment 2

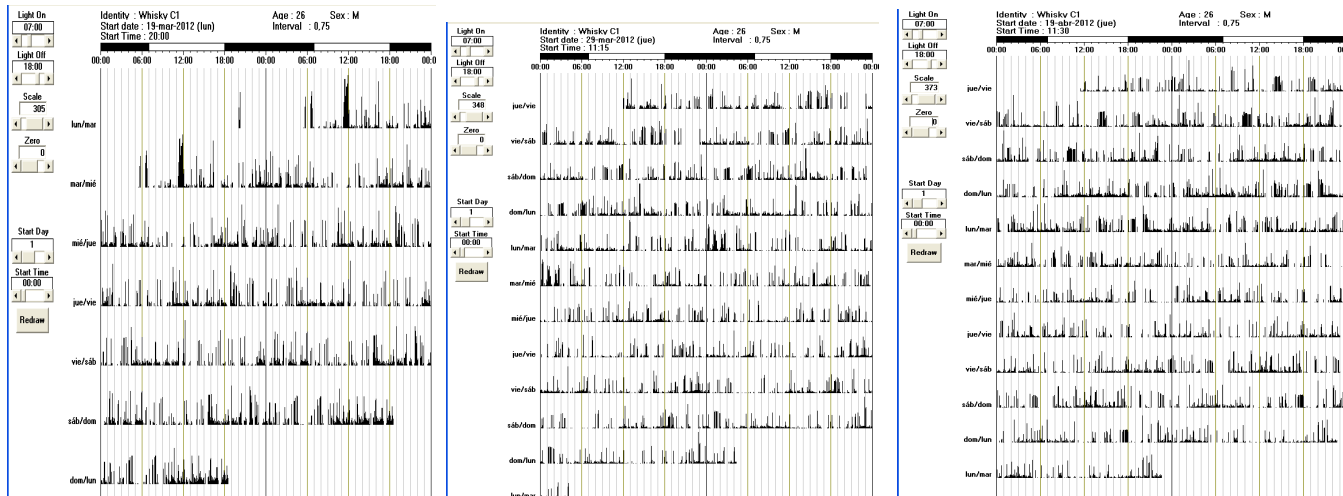
Cavall 1 (Whisky) amb una edat de 28 anys. Dit per el propietari no va notar cap canvi en el comportament de l'animal. Un cop durant la nit es va anar a veure com reaccionava el cavall davant les alarmes nocturnes i no va semblar que aquell horrible soroll l'afectes gaire.

Cavall 3 (Universo) amb una edat de 21 anys. Jo mateixa convisc amb aquest cavall i puc garantir que durant les alarmes el cavall corria espantat d'un lloc a un altre del seu tancat tot espantat. Durant algun vespre va despertar mes d'un cop algun membre de la família el soroll que ell causava. Casualment va coincidir que la setmana que li vàrem fer aquesta prova, aquest cavall estava en una època de entrenament quasi diari per que se estava preparant per unes exhibicions per a les festes del poble. El seu amo hem va comunicar que el seu rendiment va ser molt menor aquells tres dies, a penes s'elevava durant els bots e inclús bavejava.

Resultats 2 i 3:

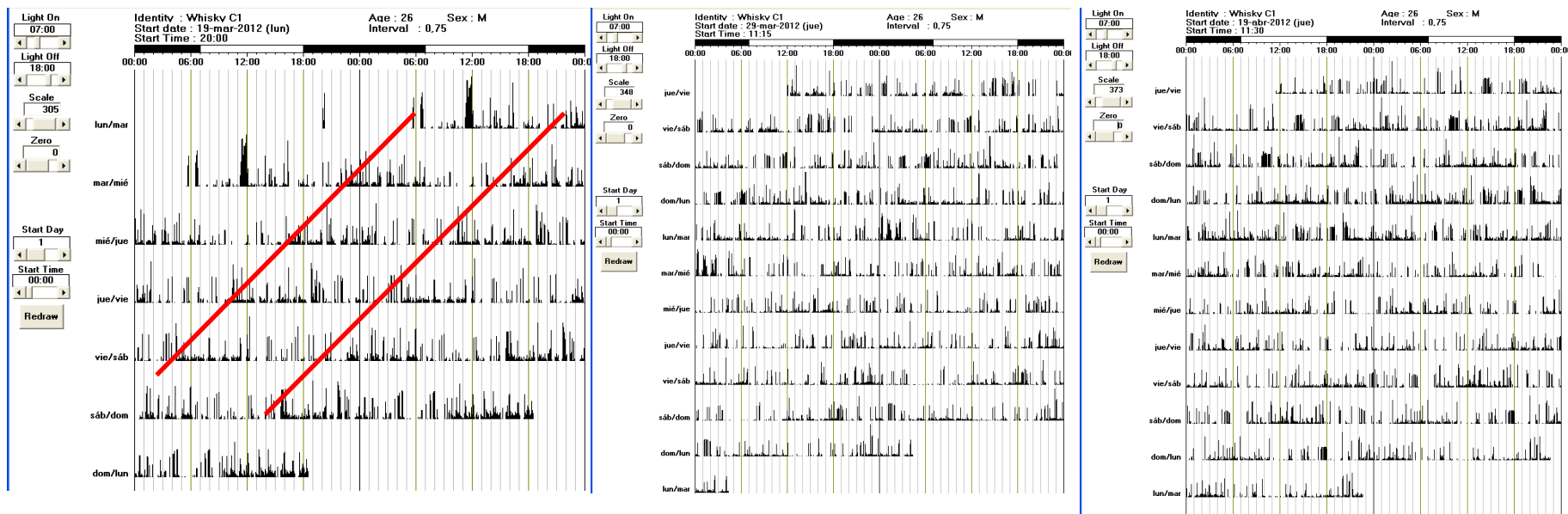
A les figures 1-4 es representa el "double plot" de cadascun dels animals amb els resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiària amb les variables analitzades (mesor, acrofase, amplitud, CFI i constant de Rayleigh) durant els tres períodes de l'experiment 1: basal, estrès i recuperació (abans, durant i després de l'aplicació de l'element estressant, respectivament).

A les figures 5-8 es representa la evolució temporal d'un període de 24 hores de l'activitat vs la llum de cadascun dels 4 cavalls. La figura 9 representa l'evolució temporal durant un període de 24 hores de l'activitat vs la llum del promig dels 4 cavalls junts. Totes les gràfiques representen els tres períodes analitzats. Es pot comprovar novament el comportament diferent de cadascun dels animals i la falta de correlació, en la major part dels casos, entre el període llum-obscuritat i l'activitat dels animals.

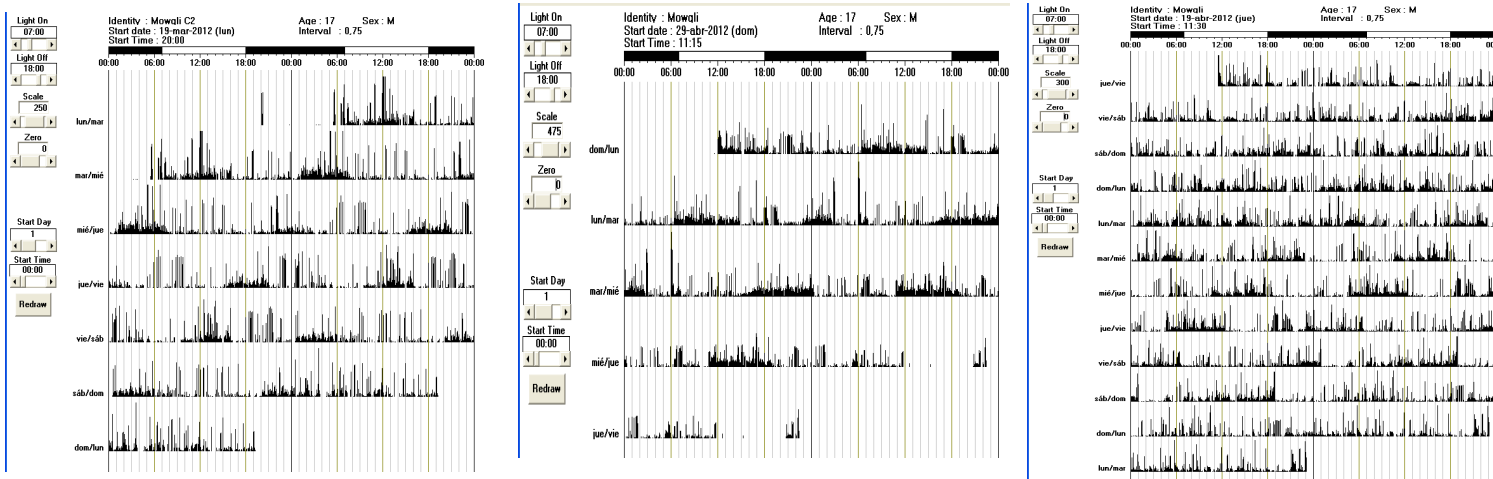


Setmana	Basal	Estrès	Recuperació
Mesor	9,07	9,26	11,06
Amplitud	12,63	11,61	14,22
Rayleigh	0,99	0,99	0,32
CFI	0,43	0,32	0,32
Acrofase	6:55	6:07	6:28
Acrofase (minuts)	415	367	388

Figura 1. Registre d'activitat i anàlisi de la funció circadiària del **Cavall 1 Whisky**. **A.** Representació de l'activitat en "Double Plot" dels tres períodes estudiats (basal, estrès i recuperació). **B.** Resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiària

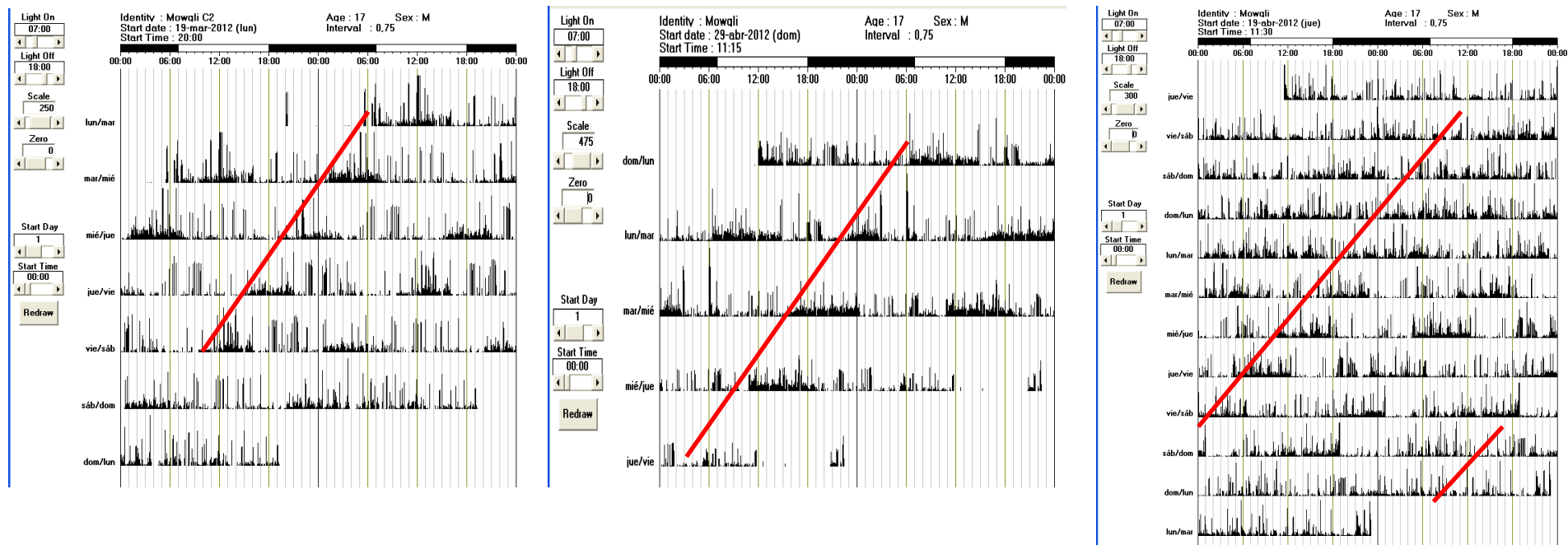


A la primera setmana s'aprecia un ritme molt feble d'aproximadament 17 hores. A partir de la segona setmana, l'activitat es fa completament arrítmica.



Setmana	Basal	Estrès	Recuperació
Mesor	8,66	16,40	15,96
Amplitud	11,88	20,54	20,91
Rayleigh	0,99	0,99	0,99
CFI	0,35	0,44	0,38
Acrofase	6:20	6:08	6:45
Acrofase (minuts)	380	368	387

Figura 2. Registre d'activitat i anàlisi de la funció circadiària del **Cavall 2 Mowgli**. **A.** Representació de l'activitat en "Double Plot" dels tres períodes estudiats (basal, estrès i recuperació). **B.** Resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiària.



S'ha assenyalat amb línies vermelles la presència d'un ritme d'unes 17 hores que es manté durant tot el temps de l'estudi.

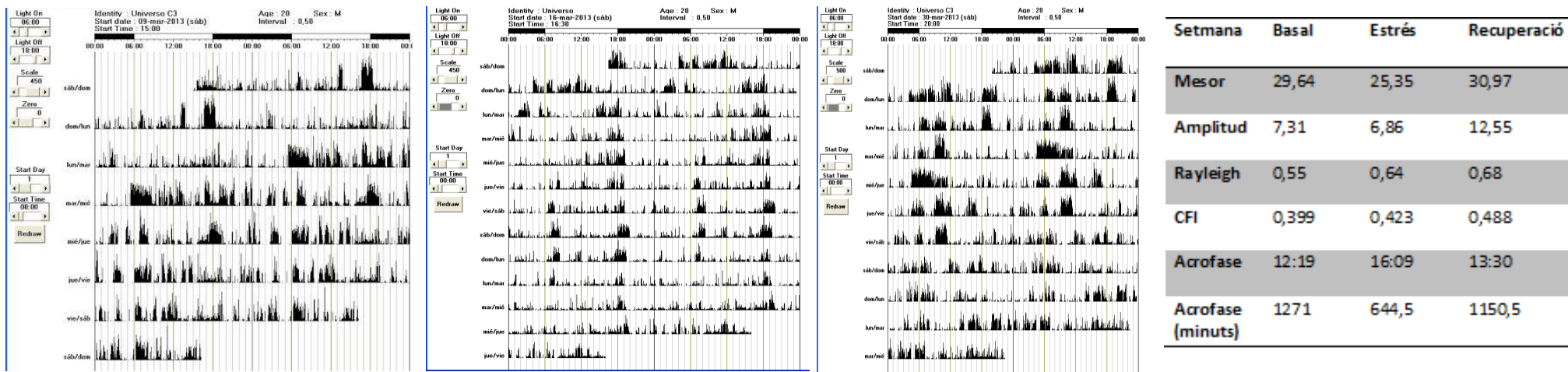
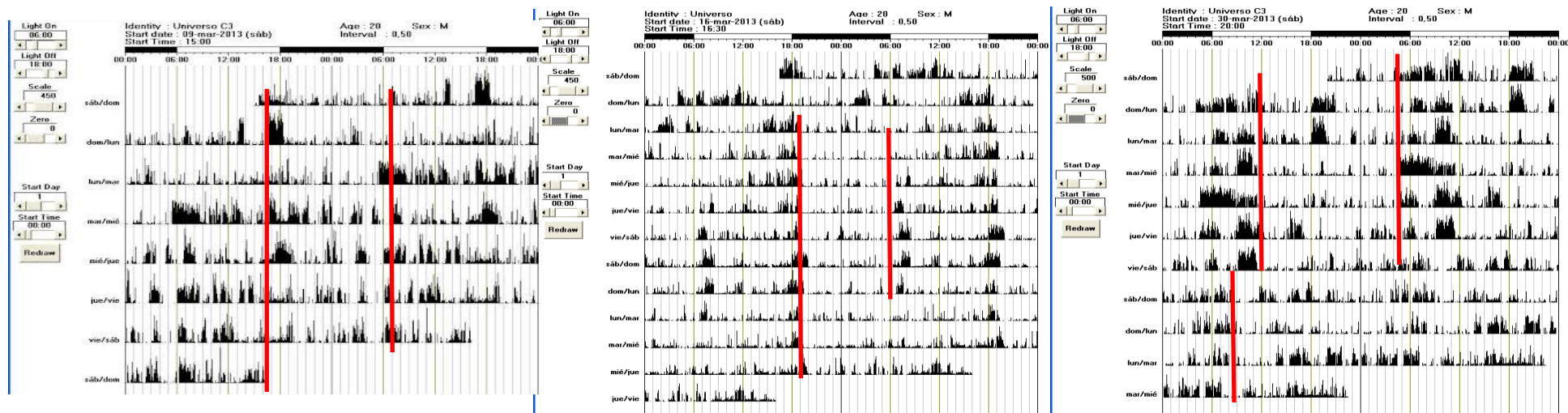
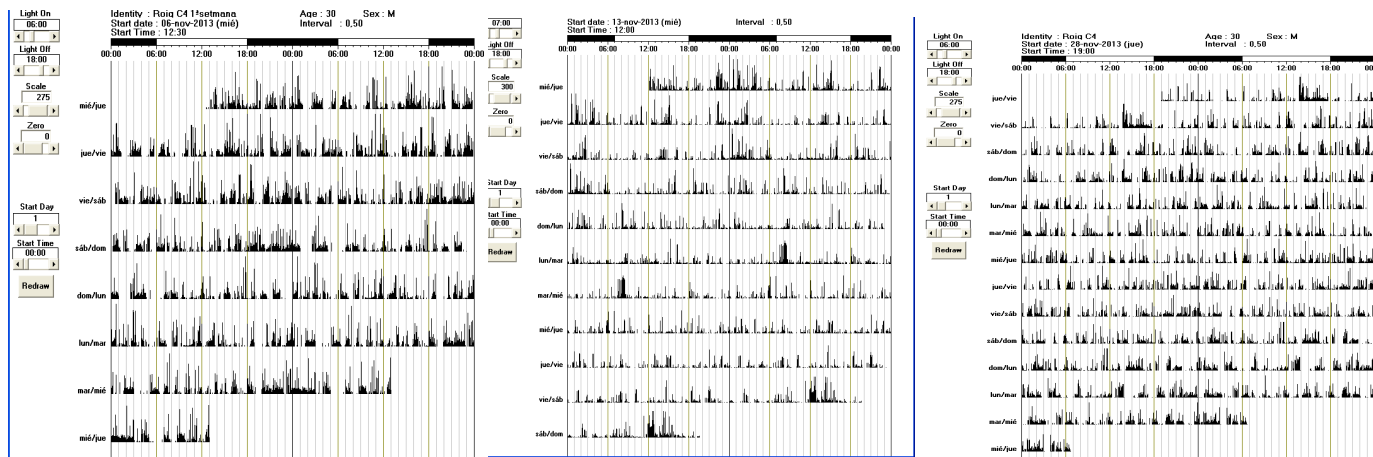


Figura 3. Registre d'activitat i anàlisi de la funció circadiana del **Cavall 3 universo**. **A.** Representació de l'activitat en "Double Plot" dels tres períodes estudiats (basal, estrès i recuperació). **B.** Resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiana.



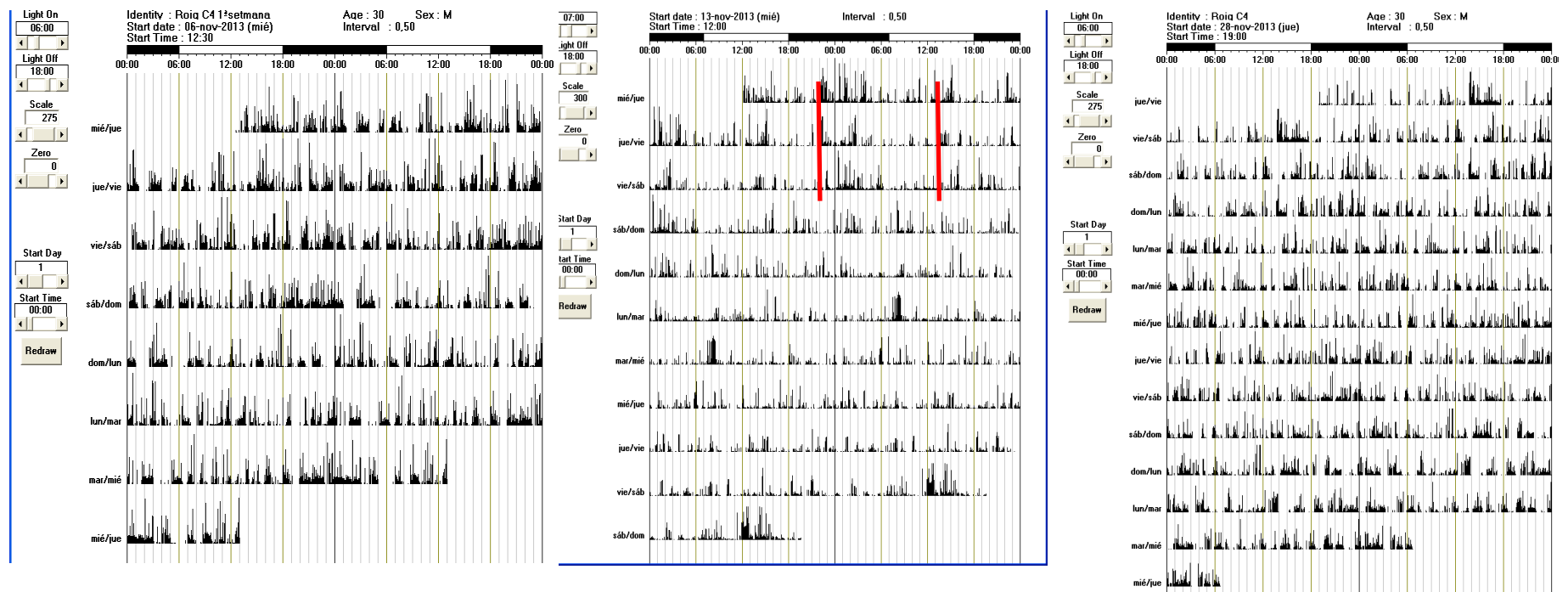
En el mateix registre de la figura 3, A s'han senyalat els ritmes amb línies vermelles. Durant la primera setmana es pot apreciar un ritme circadiani feble, amb un brot d'activitat que apareix de forma irregular al voltant de l'alba i desapareix al migdia. Hi ha un segon brot després de la posta del sol fins a la mitjanit. L'activitat total disminueix durant la segona setmana (estrès) i el brot d'activitat posterior a l'alba desapareix. Durant la tercera setmana (recuperació) hi ha un fort augment de l'activitat

en la primera part de la fase il·luminada dels primers sis dies. A partir d'aquest moment l'activitat es redueix i apareix avançament de fase en el final del brot diürn d'activitat.



Setmana	Basal	Estrès	Recuperació
Mesor	11,01	6,70	9,58
Amplitud	2,01	5,86	1,75
Rayleigh	0,64	0,92	0,76
CFI	0,28	0,38	0,30
Acrofase	21:12	10:44	19:10
Acrofase (minuts)	1271	644,5	1150,5

Figura 4. Registre d'activitat i anàlisi de la funció circadiària del **Cavall 4 Roig**. **A.** Representació de l'activitat en "Double Plot" dels tres períodes estudiats (basal, estrès i recuperació). **B.** Resultats de l'anàlisi paramètric i no paramètric de la funció circadiària.



S'ha assenyalat un ritme circadiari feble amb augments d'activitat que es produeixen durant la segona meitat de les dues fases durant els tres primers dies, amb un retard de fase d'unes quatre hores. En la resta de registres no s'aprecia cap tipus de ritmicitat.

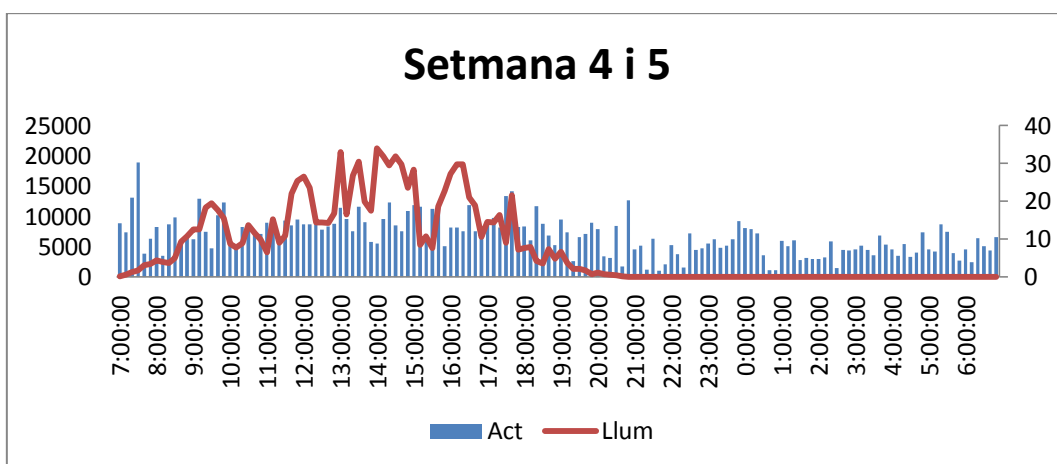
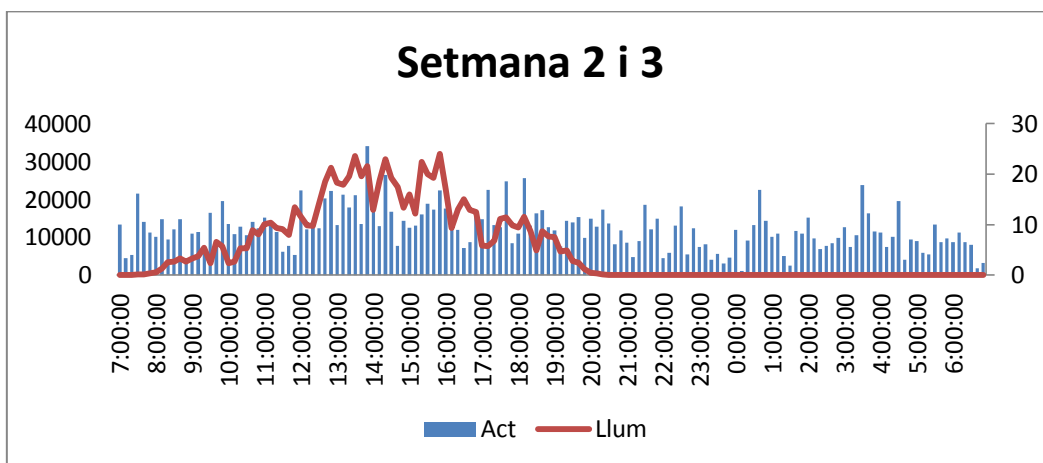
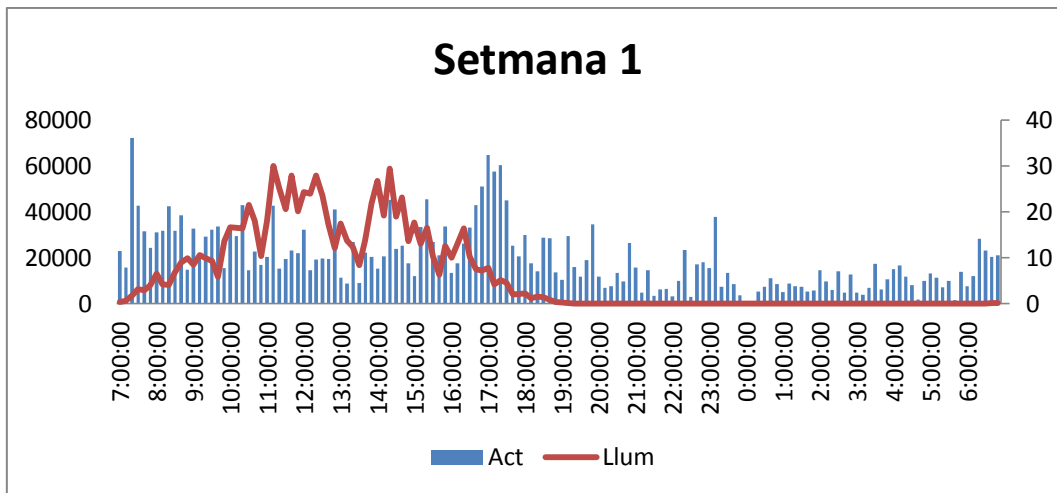


Figura 5. Dades del cavall 1 Whisky. Representació de l'activitat vs la llum en cada un dels períodes. En la primera gràfica obtenim els valors basals, la segona gràfica correspon al període d'estrès i per últim la tercera gràfica fa referència al període de recuperació i al seu estil de vida quotidià.

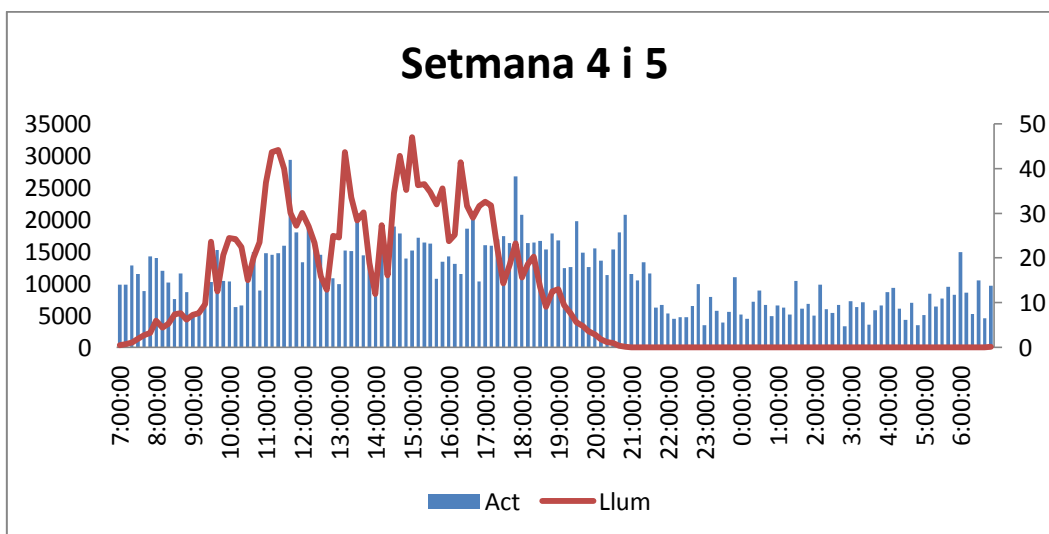
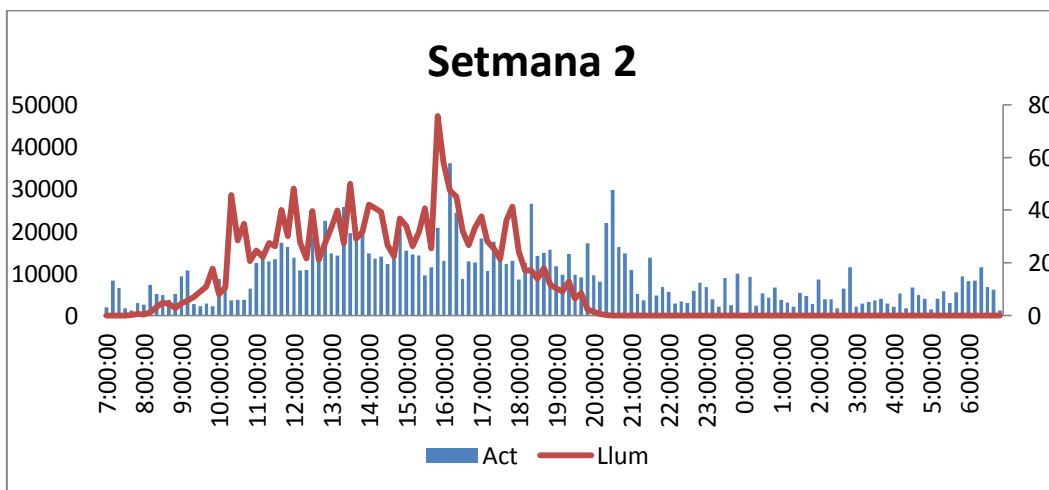
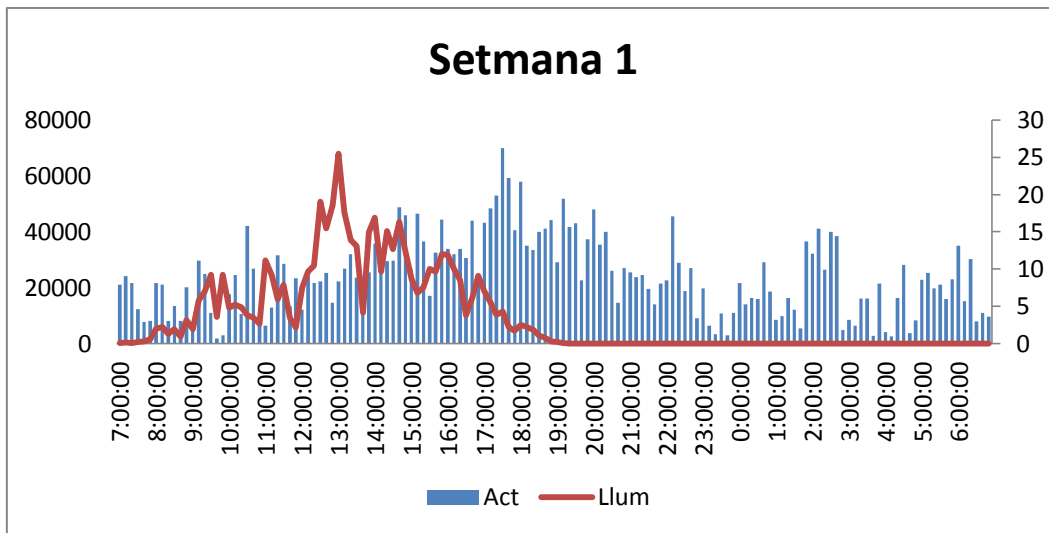


Figura 6. Dades del cavall 2 Mowgli. Representació de l'activitat vs la llum en cada un dels períodes. En la primera gràfica obtenim els valors basals, la segona gràfica correspon al període d'estrès i per últim la tercera gràfica fa referència al període de recuperació i al seu estil de vida quotidià.

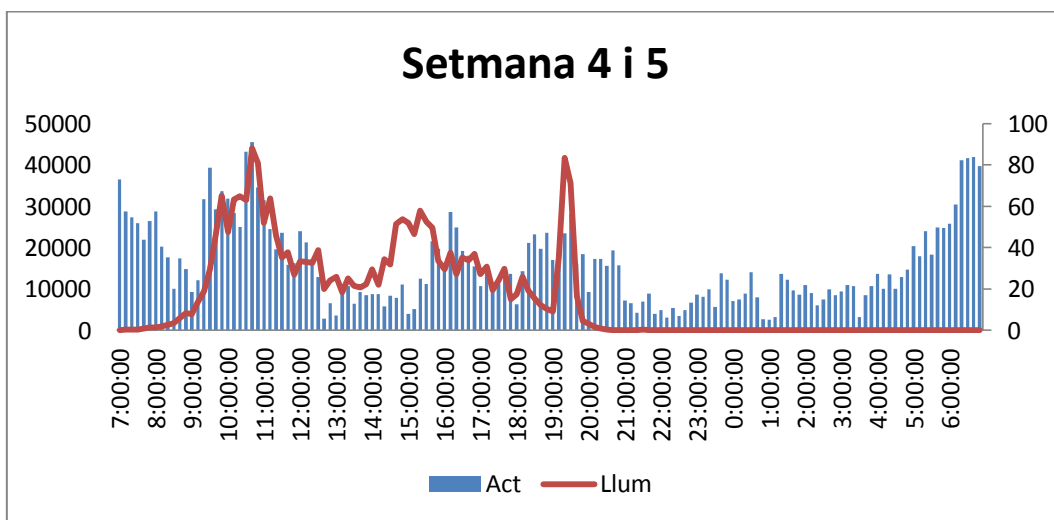
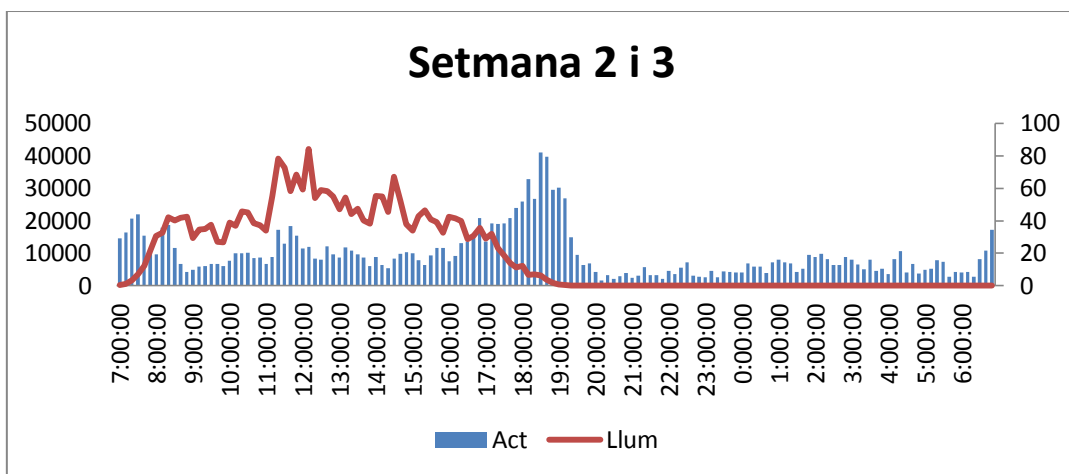
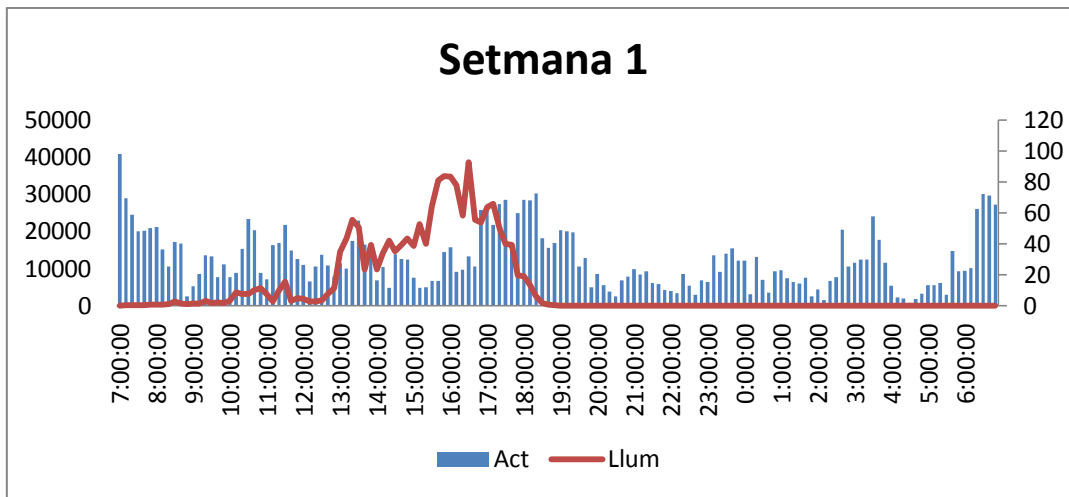


Figura 7. Dades del cavall 3 Universo. Representació de l'activitat vs la llum en cada un dels períodes. En la primera gràfica obtenim els valors basals, la segona gràfica correspon al període d'estrès i per últim la tercera gràfica fa referència al període de recuperació i al seu estil de vida quotidià.

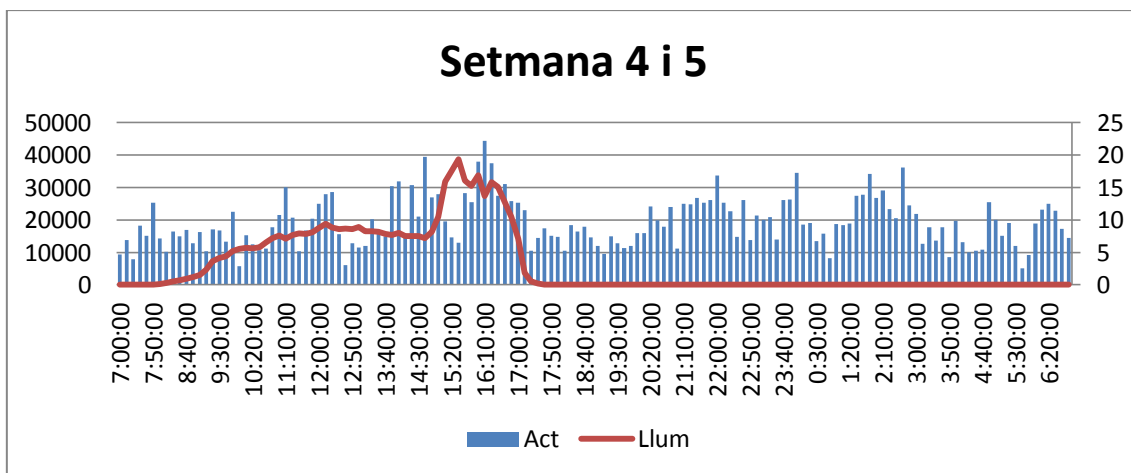
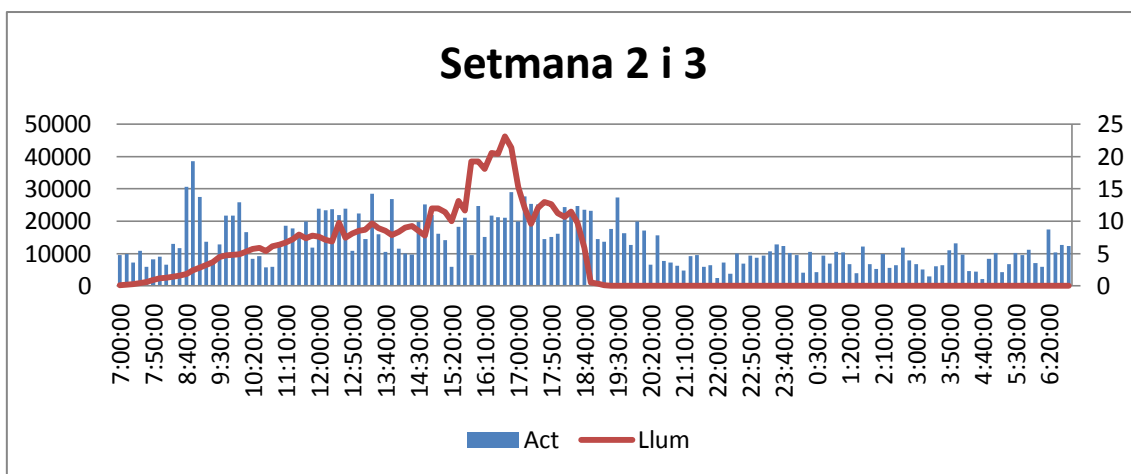
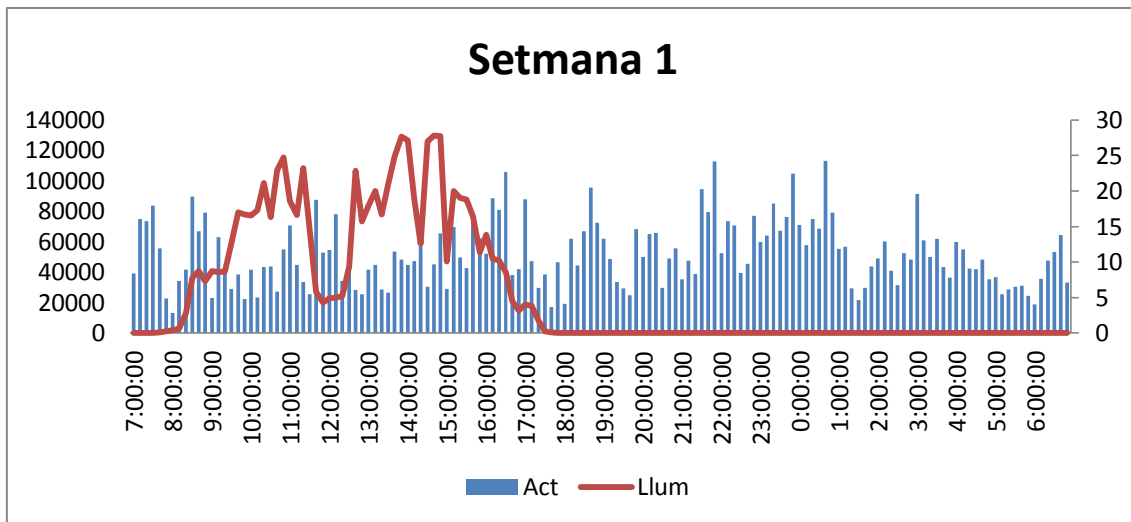


Figura 8. Dades del cavall 4 Roig. Representació de l'activitat vs la llum en cada un dels períodes. En la primera gràfica obtenim els valors basals, la segona gràfica correspon al període d'estrès i per últim la tercera gràfica fa referència al període de recuperació i al seu estil de vida quotidià.

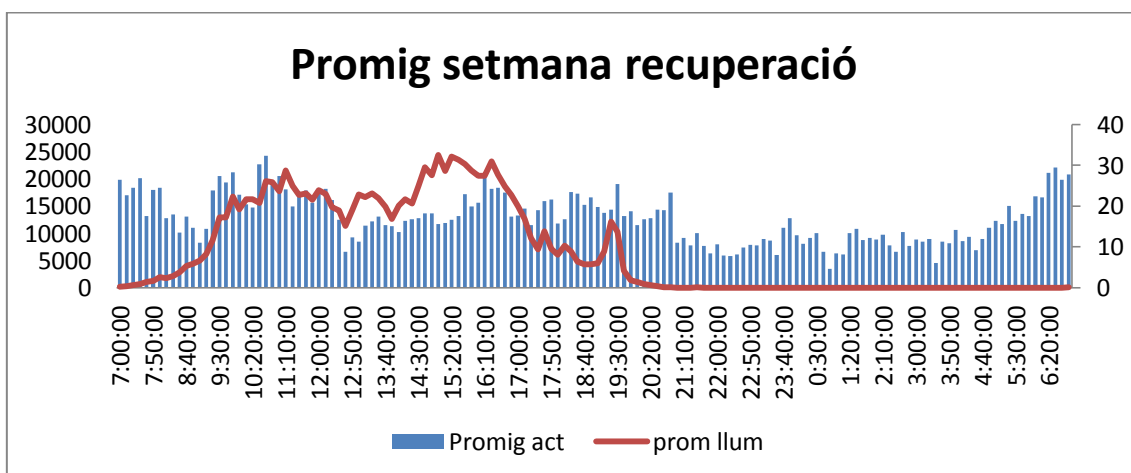
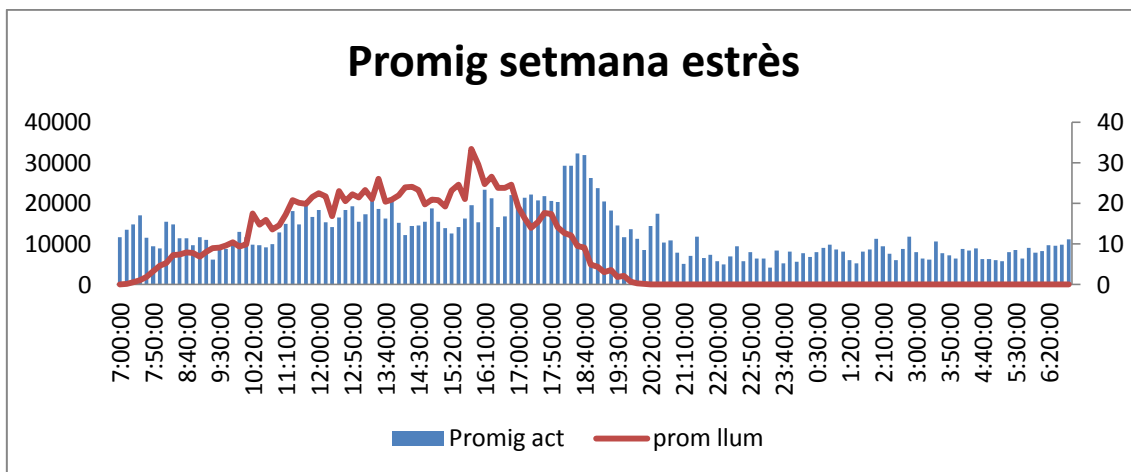
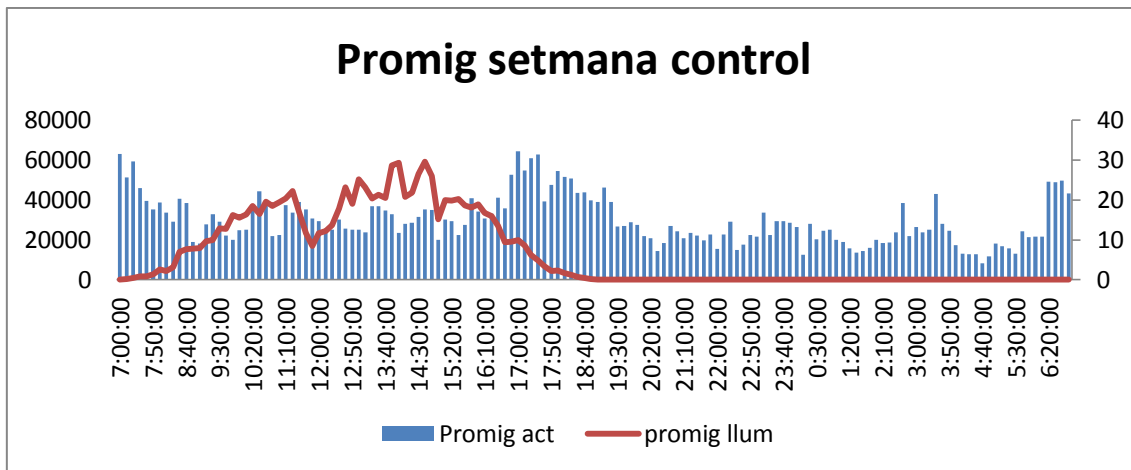


Figura 9. Promig dels 4 subjectes. Representació de l'activitat vs la llum en cada un dels períodes. En la primera gràfica obtenim els valors basals, la segona gràfica correspon al període d'estrès i per últim la tercera gràfica fa referència al període de recuperació i al seu estil de vida quotidià.

Resultats 4:

A les figures 10 i 11 següents s'exposen els resultats corresponents, primer, a la activitat mitjana del grup complet dels quatre cavalls (fig. 10) i a continuació, a cadascun dels animals (fig.11.A; 11.B; 11.C i 11.D).

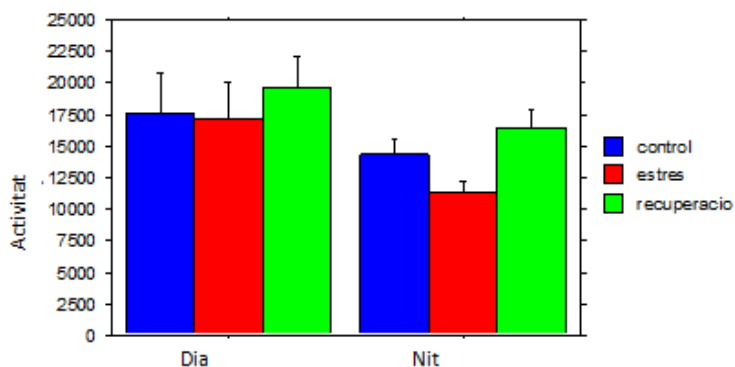
Pel que fa als resultats de grup complet, s'observa que l'estrès suposadament produït pel canvi d'estable no ha fet cap efecte significatiu i només s'ha observat un efecte molt significatiu de la llum, amb una disminució molt significativa de l'activitat durant el període fosc.

Després de veure els resultats del grup complet, es va decidir analitzar l'activitat de cadascun dels quatre cavalls. Com a resultat, es va observar que el comportament de cadascun dels quatre animals va ésser prou diferent. Como es pot comprovar l'activitat del cavall Whisky no es va veure modificada ni per la llum, ni pel tractament.

Resultats: Anova dels quatre cavalls

Variable dependent: activitat

Variabels independents: llum i tractament



	N	Mitjana	Desv tip	SEM
Dia Control	25	17576,280	15772,086	3154,417
Dia Estrès	34	17210,294	16707,105	2865,245
Dia Recuperació	40	19665,825	15251,307	2411,443
Nit Control	24	14309,667	5847,865	1193,690
Nit Estrès	35	11325,857	5759,842	973,591
Nit Recuperació	43	16375,930	9235,482	1408,398

Significació dels efectes

Llum $F=5.399$, $p<0.02$

Tractament $F= 1.7$, ns

Anàlisi Post Hoc (PLSD)

Diferència Control- Estrès: ns

Diferència Control- Recuperació: ns

Diferència Estrès Recuperació: 0.0649 (Marginalment significatiu)

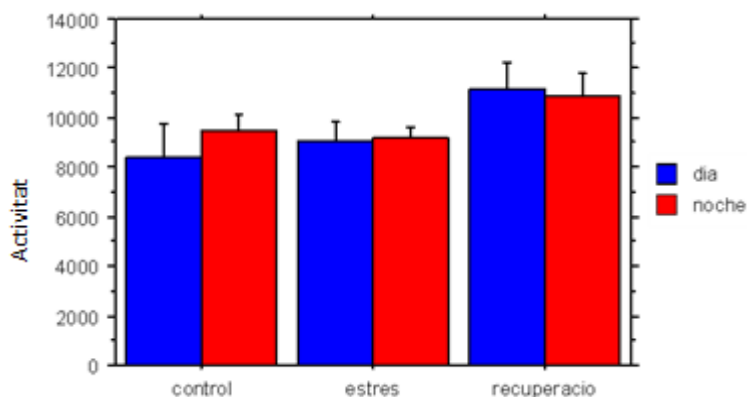
Figura 10. Representació gràfica de les dades d'activitat obtingudes de un promig dels 4 cavalls. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim els valors de l'activitat respecte al període del dia que ens trobem, dia o nit (a l'eix horitzontal). El color blau indiquen les dades control, el color vermell representa les dades produïdes durant l'estrès i per últim les barres de color blau representen els valors de recuperació.

Anova per cavalls independents : 1

Cavall 1 Whisky

Variable dependent: activitat

Variabels independents: llum i tractament



	n	Mitjana	Desy tip	SEM
Dia Control	6	8375,500	3370,932	1376,177
Dia Estrés	5	9510,400	1399,926	626,066
Dia Recuperació	4	9057,250	1613,573	806,787
Nit Control	4	9154,500	1013,371	506,685
Nit Estrés	7	11144,714	2970,080	1122,585
Nit recuperació	9	10838,778	2867,821	955,940

Significació dels efectes

Llum F = 0.114 ns

Tractament F = 2.523, p<0.0977, ns

Anàlisi Post Hoc (PLSD)

Diferencia Control- Estrès ns

Diferencia Control- Recuperació p < 0.0492

Diferencia estrès recuperació ns

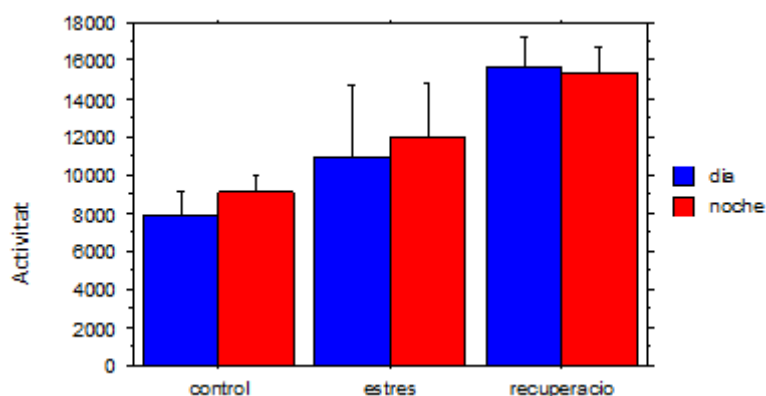
Figura 11. A. Representació gràfica de les dades d'activitat obtingudes del cavall 1. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+- SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim els valors de l'activitat respecte al període en el que es troba el subjecte, primer hi ha representades les dades control, seguides de les dades de estrès i finalment les dades de recuperació. Cada un dels tres períodes està separat per dues barres una de color blau que representen les dades diürnes i una barra de color blau que representa les dades de la nit.

Anova per cavalls independents: 2

Cavall 2 Mowgli

Variable dependent: activitat

Variabels independents: llum i tractament



	n	Mitjana	Desv tip	SEM
Dia, Control	6	7844,500	3195,079	1304,386
Dia Estrès	5	9062,600	2204,807	986,020
Dia, Recuperació	4	10983,000	7487,932	3743,966
Nit Control	4	12009,000	5696,515	2848,258
Nit Estrès	7	15654,571	4097,539	1548,724
Nit recuperació	9	15411,889	3788,443	1262,814

Significació dels efectes

Llum F = 0.66, ns

Tractament F = 8.702, p<0.0011

Anàlisi Post Hoc (PLSD)

Diferència Control- Estrès p < 0.137 ns

Diferència Control- Recuperació p < 0.0003

Diferència estrès recuperació p <0.0418

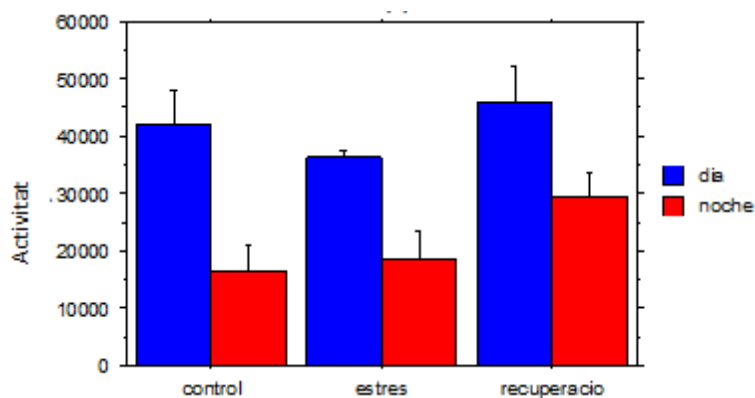
Figura 11.B. Representació gràfica de les dades d'activitat obtingudes del cavall 2. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim els valors de l'activitat respecte al període en el que es troba el subjecte, primer hi ha representades les dades control, seguides de les dades de estrès i finalment les dades de recuperació. Cada un dels tres períodes està separat per dues barres una de color blau que representen les dades diürnes i una barra de color blau que representa les dades de la nit.

Anova per cavalls independents: 3

Cavall 3 Universo

Variable dependent: activitat

Variabels independents: llum i tractament



	n	Mitjana	Desv tip	SEM
Dia, Control	6	41869,000	14515,020	5925,732
Dia Estrès	5	16420,600	9967,414	4457,563
Dia, Recuperació	4	36252,000	2238,819	1119,410
Nit Control	4	18562,750	9497,843	4748,921
Nit Estrès	7	45818,571	16874,593	6377,997
Nit Recuperació	9	29374,000	12062,285	4020,762

Significació dels efectes

Llum $F = 19.932$, $p < 0.0001$

Tractament $F = 2.325$, ns

Anàlisi Post Hoc (PLSD)

Diferència Control- Estrès: ns

Diferència Control- Recuperació: ns

Diferència Estrès- Recuperació: ns

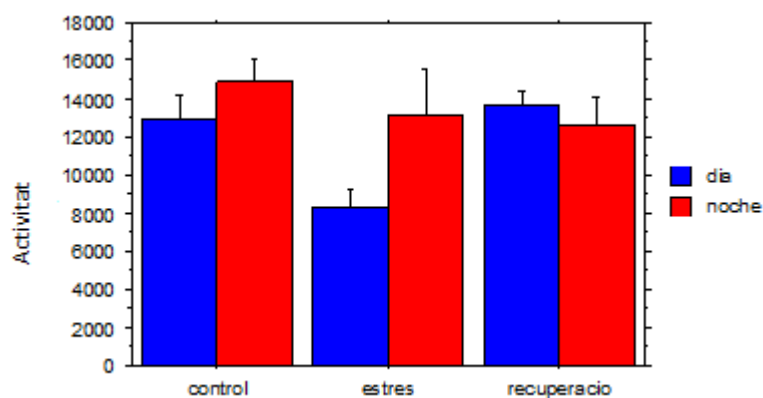
Figura 11.C. Representació gràfica de les dades d'activitat obtingudes del cavall 3. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+- SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim els valors de l'activitat respecte al període en el que es troba el subjecte, primer hi ha representades les dades control, seguides de les dades de estrès i finalment les dades de recuperació. Cada un dels tres períodes està separat per dues barres una de color blau que representen les dades diürnes i una barra de color blau que representa les dades de la nit.

Anova per cavalls independents : 4

Cavall 4 Roig

Variable dependent: activitat

Variabels independents: llum i tractament



	n	Mitjana	Desv tip	SEM
Dia, Control	6	12955,500	2971,268	1213,015
Dia Estrès	5	14864,400	2689,194	1202,644
Dia, Recuperació	4	8331,750	1976,361	988,180
Nit Control	4	13134,250	4832,026	2416,013
Nit Estrès	7	13696,429	2083,523	787,498
Nit recuperació	9	12690,778	4087,261	1362,420

Significació dels efectes

Llum $F = 0.66$, ns

Tractament $F = 8.702$, $p < 0.0011$

Anàlisi Post Hoc (PLSD)

Diferència Control- Estrès: $p < 0.0528$

Diferència Control- Recuperació: ns

Diferència estrès recuperació: ns

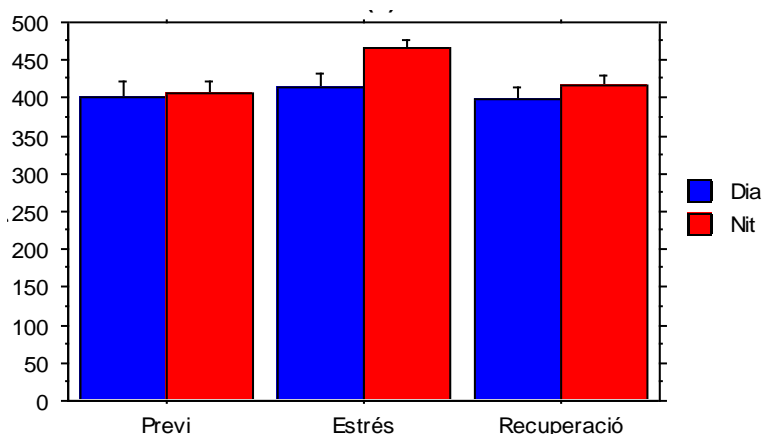
Figura 11.D. Representació gràfica de les dades d'activitat obtingudes del cavall 4. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim els valors de l'activitat respecte al període en el que es troba el subjecte, primer hi ha representades les dades control, seguides de les dades de estrès i finalment les dades de recuperació. Cada un dels tres períodes està separat per dues barres una de color blau que representen les dades diürnes i una barra de color blau que representa les dades de la nit.

Resultats 5:

A la figura 12.A i 12.B representen els minuts d'immobilitat corresponents a la mitjana dels 4 cavalls i el nombre de períodes d'immobilitat de duració superior a 1 minut corresponents a la mitjana dels 4 cavalls, respectivament.

Quantificació de la immobilitat diürna i nocturna

Minuts d'immobilitat



Anàlisi de la Variància: efecte combinat dia- nit enfront del tractament

$$F = 1.116, p < 3.296, ns$$

Post Hoc (PLSD)

Diferència entre dia- nit: $p < 0.0523$ (marginalment significativa)

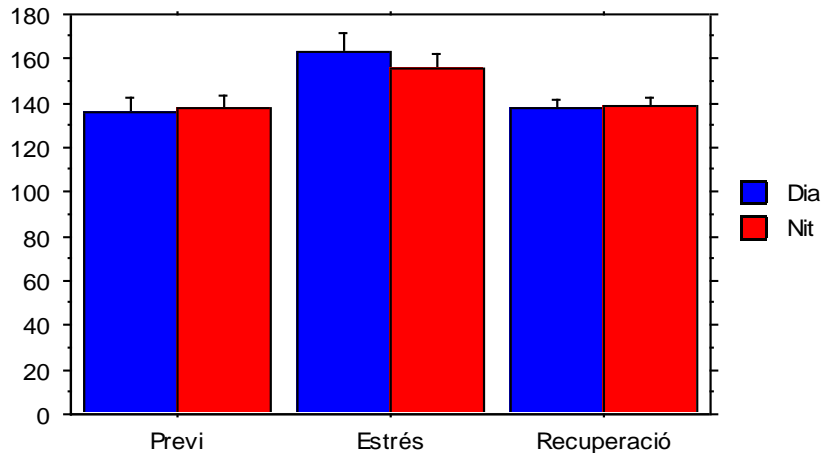
Diferència entre previ- estrès: $p < 0.747$, ns

Diferència entre previ- recuperació: $p < 0.747$, ns

Diferència entre estrès- recuperació: $p < 0.0552$ (marginalment significativa)

Figura 12. A Representació gràfica dels minuts d'immobilitat corresponents a la mitjana dels 4 cavalls. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+ SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim el nombre de minuts en el quals els subjectes varen estar immòbils. A l'eix horitzontal tenim representats 3 blocs corresponents als tres períodes estudiats (control, estrès i recuperació). De color blau tenim representats els valors corresponents al dia i de color vermell tenim representats els valors corresponents a la nit.

Nombre de períodes d'immobilitat de duració superior a 1 minut



Anàlisi de la Variància: efecte combinat dia-nit enfront del tractament

$F = 0.338$, $p < 0.7136$, ns

Post Hoc (PLSD)

Diferència entre dia-nit: $p < 0.561$, ns

Diferència entre previ-estrès: $p < 0.005$

Diferència entre previ-recuperació: $p < 0.7579$, ns

Diferència entre estrès-recuperació: $p < 0.003$

Figura 12 B. Representació gràfica del nombre de períodes d'immobilitat de duració superior a 1 minut corresponents a la mitjana dels 4 cavalls. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana (+SEM). S'ha realitzat un anàlisi de la variància Anova. A l'eix vertical tenim el nombre de moments en el quals els subjectes varen estar immòbils. A l'eix horitzontal tenim representats 3 blocs corresponents als tres períodes estudiats (control, estrès i recuperació). De color blau tenim representats els valors corresponents al dia i de color vermell tenim representats els valors corresponents a la nit.

Discussió:

De forma resumida, els resultats més importants, els quals seran discutits son els següents:

Ritmes circadiaris

Els animals han mostrat uns ritmes circadiaris molt febles com es pot deduir a partir de l'observació de l'activitat en els registres "double plot" (figures 1-4) i en els promitjos d'activitat diària, en els quals en molts pocs casos es va fer visible una correlació entre les hores de fosc-llum i l'activitat dels animals. Aquests resultats es confirmen quan comparem els valors del mesor amb els de l'amplitud. Tenint en compte que aquest darrer ens indica l'excursió del màxim i del mínim per sobre i per davall del promig (el mesor) observem que l'amplitud (l'excursió al voltant del mesor) només va aconseguir valors pròxims als del mesor en els cavalls 1 i 2, però en els cavalls 3 i 4, aquest valor va ser molt inferior. Aquest resultat rep confirmació quan observem els valors de l'índex CFI que en la totalitat dels casos es troben per sota de 0,5. Donat que el CFI o índex d'ajust comparatiu de Bentler oscil·la entre 0 i 1 i els valors pròxims a 1 indiquen una major robustesa dels ritmes d'activitat, i els valors pròxims a 0 indiquen un desajust elevat, es fa evident que l'ajustament dels cavalls al cicle diari de llum-fosc es molt baix.

La debilitat dels ritmes i la seva escassa correlació amb les oscil·lacions en els nivells diaris de llum es confirmen quan observem les figures 5 a 9. Encara que l'anàlisi de tot el grup demostra que les diferències en l'activitat diürna i nocturna son significatives, l'anàlisi post hoc demostra que aquestes diferències només son significatives per al cavall 3, Universo i que en els altres tres no existeixen. Per últim, les figures 12.A i 12.B mostren, a l'igual que amb els resultats anteriors, que no hi ha diferències significatives entre el total de minuts d'immobilitat durant el dia i la nit, ni tampoc en el nombre de períodes d'immobilitat amb una duració superior a 1 minut

Revisada la literatura, no hi ha dades sobre l'activitat circadiària dels cavalls. Tot i així, hi ha abundància de publicacions que demostren que els animals presa dormen menys que els depredadors els quals tenen un son mes lleuger, un nombre superiors de despertars i el son es fracciona amb abundants períodes de vigília (Allison and Cicchetti, 1976, Lima et al, 2005, Capellini et al 2010). Tenint en compte aquestes revisions, els resultats obtinguts en el present treball concorden plenament amb les dades conegudes fins ara.

L'actigrafia com a indicador del son.

Hi ha nombrosos treballs realitzats en els éssers humans que mostren una elevada correlació entre el repòs motor, registrat per actigrafia i el son registrat poligràficament (Sadeh et al, 1994, Reid i Dawson, 1999, Sadeh i Acebo, 2002). No obstant això, la validesa de l'actigrafia és baixa per a aquells pacients amb insomni en què apareixen llargs períodes d'immobilitat mentre el subjecte es troba despert (Sadeh i Acebo, 2002). És probable que la suposada correlació entre una reduïda activitat i el son poligràfic sigui un problema de importància en el present estudi. Per una part, es sabut que la particular estructura anatòmica de les potes del cavall permeten el manteniment d'una postura erecta sense necessitat d'activitat muscular (Otfinoski, 2009, Becker, 2010). Per això, és perfectament possible que un cavall mantingui les potes immòbils durant períodes prolongats tot i que estigui despert i també es sap que pot dormir sense necessitat de recolzar-se a terra (Ruckebush, 1974). Alguns dels resultats del present treball afegixen evidència a aquesta possibilitat ja que 1- l'estrès degut al canvi de estabul no ha modificat els nivells d'activitat (figures 5 a 9) i 2- l'estrès ocasionat per el fort renou tampoc va determinar modificacions en els nivells d'activitat. Aquests resultats poden ser el resultat de dos efectes contraposats. En la majoria d'animals l'estrès determina reduccions en la quantitat i l'eficiència del son. La conseqüència immediata de l'exposició a una situació estressant és el que ha estat definit com la Síndrome d'Adaptació (Selye, 1950) i hi ha una enorme quantitat de referències demostrant que una de les respostes més comuns a l'estrès, tant crònic, com agut, és l'increment en la vigilància, tant en animals (Palma et al, 2000, Pawlyk et al, 2008, Kant et al, 1995) com en els éssers humans (Fuller et al, 1997, Papadimitriou and Linkowski, 2005, Spoomaker and van den Bout, 2005). De fet tots els procediments experimentals per a produir la privació del son, aconseguixen el seu objectiu sotmetent als animals a algun tipus d'estímul estressant. D'acord amb això, la disminució del son queda reflectida en l'actigrafia, com un augment en l'activitat. Tot i això, la generalitat dels animals mostren tres tipus de resposta davant una situació de perill: atac, fugida o immobilitat (Stress Specific Defensive Reactions, Bolles, 1970). El que un animal donat respongui amb un o altre tipus de resposta depèn de molts aspectes de la situació estressant i també de l'espècie. Però és evident que, de les tres respostes, la fugida i la lluita es manifestaran a l'actigrafia com augments en l'activitat general de l'animal. Per contra, la immobilitat donarà un registre igual al que s'observarà si l'animal es quedés adormit.

D'acord amb les observacions més comuns, la resposta més immediata del cavall, com la de tots els herbívors, és la fugida. No obstant això, quan el cavall està estabulat, la fugida és impossible i, per descomptat, la lluita també. Per tant, l'única reacció possible per a un cavall estabulat és la immobilitat. Per això, s'ha de concloure que les reduccions en l'activitat registrades davant d'una situació estressant no poden ser interpretades com augment en la producció de son.

El son en el cavall

D'acord amb les dades conegudes (McNamara et al, 2008) a la base de dades sobre la filogènia del somni (<http://www.bu.edu/phpbin/sleep/search/>) només hi ha un registre sobre el son al cavall:

Equus Caballus – Ruckebusch Et AL., 1970			
Common Name:	Horse	EEG or ECoG Used:	Yes
Recording Length:	2 (At least 12, but less than 24 hours)	Age Class:	N/A
Lab Condition Score:	12	Daily Sleep Time:	4.368 Hours
Number of Animals:	2	Sleep Type:	N/A

Com es pot comprovar, l'estudi ja té 40 anys i des de llavors ningú ha confirmat ni repetit els resultats. A més, només van estudiar dos animals, encara que el mètode d'estudi va estar basat en l'anàlisi de l'EEG i va ser realitzat durant més de 12, però menys de 24 hores. A més, no es van subministrar dades sobre l'edat dels animals estudiats. Davant l'estudi de Ruckebusch et al (1970) aquest estudi presenta alguns aspectes avantatjosos i alguns desavantatjosos. En primer lloc, s'han estudiat quatre animals, el que ha permès fer una anàlisi estadística de tot el conjunt amb alguns resultats significatius. D'altra banda, el present estudi s'ha restringit a registrar únicament l'activitat general dels animals, enfront del de Ruckebusch, que va realitzar una polisomnografia completa. En els paràgrafs anteriors ja s'ha discutit el reduït valor que té, en el cavall, l'actigrafia com una indicadora del son. A més, aquest treball només ha estudiat animals d'edat avançada (mitjana, 22.5 anys) ja que, segons les dades obtingudes en diverses fonts d'internet: (<http://horses.about.com/od/understandinghorses/qt/horseage.htm>; <http://horses.about.com/od/understandinghorses/tp/Horses-Age-How-Long-Horses-Live-Lifespan.htm>) la vida sencera d'un cavall és de 28 ± 5 anys, és a dir oscil·la entre 23 i 33 anys.

És sabut que en l'espècie humana, el somni pateix importants canvis amb l'edat: 1) tornant-se més fràgil, 2) amb interrupcions freqüents, 3) amb reduccions en la potència delta, 4) accentuant la tendència a distribuir-se entre les 24 hores del dia, 5) amb diverses migdiades i 6) amb avenços de fase (Feinberg, 1974, Gillin et al, 1981, Webb, 1989).

Les dades obtingudes en aquest treball permeten suposar que el son en els cavalls d'edat avançada presenten algunes característiques similars a les dels éssers humans ancians.

Naturalment, també és d'esperar que es manifestin importants diferències entre el somni del cavall i, per exemple, un ésser humà. El cavall és un animal presa que viu en espais oberts i, naturalment, el seu somni està adaptat a l'ambient i, com ja s'ha esmentat, els animals presa dormen menys que els depredadors, que el seu somni és més lleuger, amb major nombre de despertars i que es fracciona amb abundants períodes intercalats de vigília. Per contra, l'ésser humà és un animal amb un somni fortament protegit, per la qual cosa un adult sa té un únic període de son

amb poques interrupcions. No obstant això, totes aquestes característiques canvien en l'humà ancià i el resultat és que la gent gran de la nostra espècie tenen un somni semblant al dels animals presa i, en concret, al del cavall. Però no oblidem que el present estudi s'ha realitzat en cavalls ancians, per la qual cosa no és possible saber si els trets descrits en el present treball són els característics de l'espècie o només són conseqüència de l'edat.

Lògicament, la resposta a aquest problema només es podrà assolir quan es realitzin experiments similars als descrits en aquest treball, però en animals joves.

Cal assenyalar que el present treball només representa una fase preliminar d'un estudi de més força emprès pel laboratori de Neurociències de la UIB que intentarà estudiar el somni dels cavalls amb una mostra més àmplia d'animals i que comprendrà totes les edats.

Conclusions

1. Els animals han mostrat uns ritmes circadianis molt febles i no s'ha trobat una correlació significativa entre les hores de obscuritat-llum i l'activitat a la majoria d'animals.
2. Els nostres resultats son concludents amb les d'altres animals presa, ja que es comú en ells dormir menys, tenir un son mes lleuger, un son fraccionat i amb abundants períodes de vigília.
3. La validesa de l'actigrafia és baixa per a aquells subjectes amb insomni en els que apareixen llargs períodes d'immobilitat mentre es troba despert. Per aquest motiu, no hem pogut correlacionar les mesures d'actigrafia al cavall amb el seu son. Aquesta idea es recolzada per la particular estructura anatòmica de les potes del cavall permeten el manteniment d'una postura erecta sense necessitat d'activitat muscular.
4. L'estrès degut al canvi de estable no ha modificat els nivells d'activitat
5. L'estrès ocasionat per el fort renou tampoc va determinar modificacions en els nivells d'activitat
6. Les dades obtingudes en aquest treball permeten suposar que el son en els cavalls d'edat avançada presenten algunes característiques similars a les dels éssers humans ancians.
7. No és possible saber si els trets descrits en el present treball són els característics de l'espècie o només són conseqüència de l'edat. La resposta a aquest problema només es podrà assolir quan es realitzin experiments similars als descrits en aquest treball, però en animals joves.

Bibliografía

Allison T, Cicchetti DV.

Sleep in mammals: ecological and constitutional correlates.
Science 1976;194:732-734.

Becker, M.

Why Do Horses Sleep Standing Up?. Hachette UK. (2010).

Bolles, R. C.

Species-specific defense reactions and avoidance learning.
Psychological review, 77(1), 32. (1970).

Campos M., Marín-Morales R., Madrid J.A., Rol M.A., Sosa J., Sosa M., Sarabia J.A., Ortiz-Tudela E., Martínez-Nicolás A., Mondéjar Abenza T., Baño Otálora B. (2010). *Circadianware*. Spain Patent 08/2010/ 183. 8 March.

Capellini I, Preston BT, MacNamara P, Barton RA, Nun CL.

Ecological constraints on mammalian sleep architecture.

In: P. MacNamara, R. A. Barton, C.L. Nun, eds. *Evolution of Sleep*, Cambridge University Press. 2010:12-33

Dallaire A. I Ruckebush Y.

Sleep Patterns in the pony with observations on partial perceptual deprivation. *Physiology and Behaviour*.

Brain Research Publications inc. 1974. Vol. 12 pp789-796.

Feinberg, I.

Changes in sleep cycle patterns with age.

Journal of psychiatric research, 10(3), 283-306. (1974).

Fuller, K. H., Waters, W. F., Binks, P. G., & Anderson, T.

Generalized anxiety and sleep architecture: a polysomnographic investigation. *Sleep Journal of Sleep Research & Sleep Medicine* 20(5), May 1997, 370-376. (1997).

Gillin, J. C., Duncan, W. C., Murphy, D. L., Post, R. M., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., ... & Bunney Jr, W. E. (1981). Age-related changes in sleep in depressed and normal subjects. *Psychiatry research*, 4(1), 73-78.

Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN, Wright WL, Covington PS.
Effects of chronic stress on sleep in rats.
Physiol Behav 1995;57:359–65.

Lima SL, Rattenborg NC, Lesku JA, Amlaner CJ.
Sleeping under the risk of predation.
Animal Behav 2005;70:723–736

Madrid Juan Antonio i Rol de Lama Ángeles.
Cronobiología. Básica y clínica.
Editec @ Red, S. L. Madrid. ISBN 84-9345-10-37. 2007

Ortiz-Tudela E., Martínez-Nicolás A., Campos M., Rol M.A., Madrid J.A. (2010). A New Integrated Variable Based on Thermometry, Actimetry and Body Position (TAP) to Evaluate Circadian System Status in Humans. *PLoS Comput Biol* 6(11): e1000996. doi:10.1371/journal.pcbi.1000996

Otfinoski, S.
Horses.
Marshall Cavendish. (2009).

Palma, B. D., Suchecki, D., & Tufik, S.
Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats.
Brain research, 861(1), 97-104. (2000).

Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J., & Brennan, F. X.
Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(1), 99-117 (2008).

Reid, K., & Dawson, D.
Correlation between wrist activity monitor and electrophysiological measures of sleep in a simulated shiftwork environment for younger and older subjects.
Sleep: Journal of Sleep Research & Sleep Medicine (1999).

Ruckebush Y.
The hypnogram as an index of adaptation of farm animals to changes in their environment.
Applied Animal Ethology 2 (1975) Amsterdam.

Sadeh, A., & Acebo, C.
The role of actigraphy in sleep medicine.
Sleep medicine reviews, 6(2), 113-124. (2002).

Sadeh, A., Sharkey, K. M., & Carskadon, M. A.
Activity-Based Sleep—Wake Identification: An Empirical Test of Methodological
Issues.
Sleep, 17(3), 201-207 (1994).

Selye, H.
Stress and the general adaptation syndrome.
British Medical Journal, 1(4667), 1383 (1950).

Spoormaker, V. I., & van den Bout, J.
Depression and anxiety complaints; relations with sleep disturbances.
European psychiatry, 20(3), 243-245. (2005).

Webb, W. B. (1989).
Age-related changes in sleep. *Clinics*.
Geriatric medicine, 5(2), 275-287.