



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Interaccions entre l'estrès, els ritmes d'activitat-repòs i els *zeitgebers* en la rata

Antoni Tortella Bernat

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Mourad Akaârir El Ghourri  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Estrès, ritmes circadians, son, zeitgebers, rata, comportament, activitat, ansietat, olor, gat



## ÍNDEX

<b>RESUM .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>I. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
I.1. RITMES BIOLÒGICS .....	5
I.2. RITMES CIRCADIANS .....	5
I.3. RITMES SON-VIGÍLIA .....	7
I.4. ESTRÈS .....	8
I.5. ESTRÈS I RITMES ACTIVITAT-REPÒS EN LA RATA .....	9
I.6. ESTRÈS I RITMES ACTIVITAT-REPÒS EN HUMANS .....	10
<b>II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS .....</b>	<b>11</b>
<b>III. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>13</b>
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>15</b>
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>19</b>
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÈNCIES .....</b>	<b>22</b>

## **RESUM**

La resposta a l'estrès és innata, i es manifesta quan un organisme pateix una amenaça que pot desafiar la seva integritat homeostàtica. Està regulada per un circuit de vies i cèl·lules neuronals que secreten per via humoral un seguit d'hormones.

Se sap que l'estrès pot ser un factor influent en patologies associades a l'alteració dels ritmes circadians, com ara el ritme de son-vigília. Una de les alteracions més comunes és l'insomni. Els efectes de l'estrès en la son poden ser diferents segons la naturalesa i intensitat de l'estímul, el temps i la durada de l'aplicació, i la tensió o vulnerabilitat individual a l'estrès.

Com a continuació del treball de Cano et al (2008) i Reyna (2018), el present projecte pretén estudiar la relació entre l'estrès i els ritmes d'activitat-repòs a la rata. Per a això, es va plantejar l'estudi de la relació entre un estímul estressant (olor de gat) conegut a la rata i la possible alteració del ritme activitat-repòs durant les 24 hores posteriors de l'exposició a l'estímul.

Es va observar una davallada de l'activitat dels animals durant la fase diürna de la segona setmana d'experimentació, corresponent amb l'exposició de l'estímul estressant de tipus olorós. L'olor de gat representa un "estímul parcial del depredador" i provoca incertesa (ansietat).

## **ABSTRACT**

The response to stress is innate, and it manifests when an organism suffers a threat that can challenge its homeostatic integrity. It is regulated by a circuit of neural channels and cells that secrete a series of hormones by humoral route.

It is known that stress can be an influential factor in pathologies associated with the alteration of circadian rhythms, such as the sleep-wake rhythm. One of the most common disorders is insomnia. The effects of sleep stress can be different depending on the nature and intensity of the stimulus, the time and duration of the application, and the individual stress or tension or vulnerability.

As a continuation of the work by Cano et al (2008) and Reyna (2018), this project aims to study the relationship between stress and activity-sleep rates at rat. For this, the study of the relationship between a stress stimulus (cat odor) known to the rat and the possible alteration of the activity-resting rate was considered during the 24 hours after exposure to stimulation.

A decrease in activity was observed during the daytime phase of the second week of experimentation, corresponding to the stimulus exposure. The cat smell represents a "partial stimulus of the predator" and causes uncertainty (anxiety).

## I. INTRODUCCIÓ

### I.1. Ritmes biològics

Els mamífers, entre altres éssers vius, presenten ritmes interns que regulen molts de processos vitals durant la seva vida (Ángeles-Castellanos et al., 2007). La presència d'un medi intern que hauria de mantenir-se constant va ser proposat per Claude Bernard (1813-1878) l'any 1842 i, al 1928 el terme *homeòstasis* va ser establert per Walter Cannon (1871-1945), que es va definir com “el conjunt de mecanismes que tendeixen a l'estabilitat en la composició bioquímica dels líquids, cèl·lules i teixits, per a mantenir la vida”.

L'evolució animal ens ha dut a perfeccionar alguns mecanismes per tal de millorar la comunicació entre el nostre cos i el medi que ens envolta (Golombek i Rosenstein, 2010). La naturalesa no és estàtica, més bé és dinàmica, pateix fluctuacions i presenta un tipus de ritmicitat. El que ho demostra són els cicles que presenta, com el canvi estacional que ocorre cada any a diferents regions del globus, els cicles lunars o els d'alternança de llum-obscuritat (Ángeles-Castellanos et al., 2007).

Els canvis ambientals cíclics són causats per l'efecte de la rotació i la translació terrestre. Per a donar una resposta davant aquests fenòmens, la selecció natural ha afavorit que tots els éssers vius hagin desenvolupat rellotges biològics que faciliten dues adaptacions claus pels organismes: la primera és que els permet anticipar-se als canvis periòdics i predictibles de l'ambient, com per exemple el canvi de les estacions, moment de còpula i cria o les migracions; i la segona és que permet la separació temporal de processos metabòlics antagònics de l'organisme, com per exemple l'activació d'enzims lipolítics i lipogènics en un mateix hepatòcit, ja que si la seva activació fos simultània, el metabolisme seria ineficaç (Madrid i Rol, 2015).

La selecció natural ha afavorit l'evolució de la ritmicitat, ja que resulta beneficiós ajustar l'activitat a les circumstàncies més favorables (Aschoff, 1964). Aquest valor adaptatiu i avantatge evolutiva de les estratègies cícliques, varen ser documentats per DeCoursey al 1997 i, més endavant, per Emerson al 2008 a uns experiments en els quals se demostrà que els organismes mutants genèticament arítmics es veuen desplaçats per la resta.

### I.2. Ritmes circadians

Els ritmes biològics no són generats pels senyals cíclics del nostre entorn. De fet, una característica important és que els ritmes biològics persisteixen quan les condicions ambientals es mantenen constants, és a dir, quan els organismes no reben senyals externs que informen dels canvis mediambientals. Aquesta és la demostració definitiva que ressalta l'existència d'un rellotge endogen que genera els ritmes biològics. D'aquesta manera, es pot determinar que els senyals ambientals tan sols ajuden a sincronitzar aquests ritmes (Ortiz-Tudela et al., 2014).

El sistema circadià dels mamífers es compon per tres elements principals: rellotges, senyals d'entrada (implicades en la sincronització amb l'ambient) i els senyals de sortida, els quals transmeten els senyals temporals a la resta d'efectors.

a) Rrellotges: El sistema circadià està format per un rellotge o marcapassos central, localitzat en el nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem (NSQ), el qual posseeix un període endogen d'aproximadament 24 hores en humans. L'anatomia del NSQ consisteix en dos petits nuclis compostos per 10.000-15.000 neurones localitzades a la zona ventral de l'hipotàlem (Cassone et al., 1988; Slat et al., 2013; Swaab et al., 1985). L'activitat del NSQ permet el manteniment dels ritmes circadianis, això és així perquè a partir de neurones aïllades del NSQ han sigut capaços de mostrar ritmes circadianis pel seu compte (Balsalobre et al., 1998; Brown i Azzi, 2013; Tosini i Menaker, 1996; Yamazaki, 2000). El NSQ envia senyals sincronitzadors als oscil·ladors perifèrics (rellotges subordinats), localitzats en els teixits i òrgans fora del sistema nerviós central, mitjançant el sistema nerviós autònom i senyals humorals com el cortisol i la melatonina.

b) Els senyals perifèrics d'entrada d'informació, anomenats *zeitgebers* (de l'alemany “donador del temps”) ajuden a sincronitzar (posar en hora) aquest marcapassos. El *zeitgeber* més important és el cicle de llum-foscor, perquè sense aquest sincronitzador el NSQ tindria unes oscil·lacions endògenes superiors a 24 hores (entre 24,5 i 25 hores). La informació fòtica arriba al NSQ a través del tracte retinohipotalàmic (TRH) format pels axons de les cèl·lules ganglionars de la retina. Aquestes cèl·lules ganglionars fotosensibles (conegudes per les seves sigles en anglès ipRGC, de *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*) es diferencien dels altres fotoreceptors (cons i bastons) perquè contenen un fotorpigment anomenat melanopsina, en lloc de la rodopsina. La melanopsina és estimulada per una longitud d'ona de 460-480nm de l'espectre visible, que correspon als tons blaus. Sent així, es pot suposar que l'espectre de llum blava és al que és més sensible el sistema circadià (Bonmatí i Argüelles, 2015). La manifestació més clara d'aquest ritme circadià és l'alternança de la son i la vigília, que es fa coincidir amb la nit i el dia, respectivament.

c) Els senyals de sortida del NSQ transmeten informació a les zones del cervell que intervenen en la regulació dels patrons de comportament, son-vigília i temperatura corporal, als centres neuroendocrins i als òrgans perifèrics. Per això, el NSQ envia projeccions nervioses, mediadors humorals, com la melatonina o el cortisol, i senyals físics com el ritme de temperatura central (Madrid i Rol, 2015).

La melatonina és el senyal de sortida més estudiat, és tracta d'una hormona produïda principalment, però no exclusivament, a la glàndula pineal (Ortiz-Tudela et al., 2015). Actualment es coneix que la seva síntesi també es produeix a òrgans extraparietals no endocrins com el cerebel, el tracte gastrointestinal, el sistema immunitari i la retina (Guerrero et al., 2007). La síntesi de la melatonina està regulada per una estimulació noradrenèrgica i per una acció inhibidora directa de la llum. Per tant, la seva producció presenta un marcat cicle circadià, amb nivells alts de melatonina durant la nit i amb

nivells baixos durant el dia. Al ritme circadià de la melatonina també se'l coneix com la “foscor química” (Madrid i Rol, 2015).

La síntesi de melatonina a la glàndula pineal comença durant el període de foscor, en el moment en què el NSQ rep els impulsos nerviosos des de la retina a través del TRH i els transmet, passant per la medulla espinal, al gangli cervical superior, on les fibres sinàptiques postganglionars alliberen noradrenalina (Lobato, 2015). L'alliberació de la noradrenalina provoca una cascada enzimàtica que condueix a la secreció de melatonina per part dels pinealocits.

Una vegada s'ha format la melatonina, és alliberada al torrent sanguini a través d'una difusió simple, on es dirigirà a les cèl·lules i teixits diana com el cervell. La melatonina no s'emmagatzema, la major part (85-90%) és metabolitzada al fetge (Lobato, 2015). El metabòlit 6-sultatoximelatonina present a l'orina és representatiu de la producció diària de l'hormona (Guerrero et al., 2007; Pandi-Perumal et al., 2006) i, a més, és la mostra més fàcil de recollir sense causar grans molèsties als subjectes.

La melatonina provoca una sèrie d'efectes, entre els quals es troben la inducció de la son i la disminució de la temperatura central (Most et al., 2010). És un dels principals senyals químics que intervé en la transferència de la informació lumínica a l'organisme, essent el senyal sincronitzador intern per a una gran quantitat de ritmes. Aquesta hormona, juntament amb el NSQ, és l'encarregada de regular els ritmes biològics de temperatura, son-vigília, i d'activitat motora, entre d'altres. A més, també s'han descrit els seus efectes antioxidants, oncostàtics i immunomoduladors (Pandi-Perumal et al., 2008).

### **I.3. Ritmes son-vigília**

Per a mamífers i aus, la definició del somni es basa en l'anàlisi de registres poligràfics (electroencefalograma, electromiograma i electrooculograma), però també és possible definir-ho com un comportament. En aquest cas el somni es defineix com un estat que presenta: a) repòs motor; b) llindars sensorials elevats; c) fàcil reversibilitat; d) organització circadiana; e) llocs definits per a dormir; f) posicions corporals específiques; i g) regulació homeostàtica (Rial et al., 2010). Aquestes característiques es troben relacionades entre elles.

Dins el son, d'acord amb paràmetres fisiològics, es defineixen dos estats: el somni NREM (“NonRapid Eye Movement”) o somni lent i el somni REM (“Rapid Eye Movement”) o somni paradoxal. Aquests són tant diferents entre si, que ells mateixos a l'estat de vigília, s'alteren durant la nit com un ritme ultradià (menor de 24h). Existeixen així, tres estats de l'ésser: vigília, son NREM i son REM, sotmesos a dos cicles biològics.

El somni pateix importants modificacions depenent de factors endògens i exògens. Entre els darrers destaquen la ingesta, els estímuls sensorial, l'exercici, etc. Entre els endògens, la organització i la quantitat de son depenent de factors circadianis i homeostàtics (Borbely, 1982). L'indicador bàsic del factor circadià és la temperatura corporal, que presenta una forta correlació amb la propensió del son. La potència delta a l'EEG augmenta o disminueix en funció del temps transcorregut amb vigília o son,

respectivament, pel que es considera l'indicador bàsic de la necessitat homeostàtica del son. A més, cada estat presenta vies de retroalimentació pròpies: la vigília té controls homeostàtics que regulen la ingesta, la defensa, la reproducció, etc., i el son té per a regular la profunditat, l'increment dels llindars sensorials, la posició corporal pròpia de l'espècie, la localització del dormitori, entre d'altres.

#### **I.4. Estrès**

L'estrès és una part inevitable de la vida, una resposta davant aquesta situació no té perquè ser dolenta, però una activació continuada d'aquesta resposta pot ser fatal per a l'organisme que el pateix (Moberg, 2000; Adamec et al., 2005).

L'adaptació conductual davant l'estrès, es relaciona amb l'increment del nivell d'alerta, de la velocitat per a processar la informació, de la capacitat per a focalitzar l'atenció, i amb la inhibició de funcions com l'alimentació i la reproducció. L'adaptació fisiològica, respon amb un augment de l'activació, de la freqüència respiratòria, de la taxa metabòlica, i amb la inhibició del sistema immunitari (Chrousos, 1995).

La probabilitat que un animal pateixi una agressió externa no és constant. De fet, els animals determinen la seva fase d'activitat i repòs en funció del perill que poden rebre, entre d'altres factors. Les agressions són més corrents durant la fase activa que durant la de repòs. És evident que el cos ha de posar en marxa una sèrie de respostes que determinen un elevat consum d'energia (Barriga-Ibars et al., 2005).

La resposta a l'estrès està organitzat per un complex sistema neuronal que segrega hormones, les quals a partir de vies o eixos es comuniquen en la resta de l'organisme. Una de les regions més importants és l'hipotàlem, on els nuclis paraventriculars (PVT) segreguen hormona alliberadora de corticotropina (CRH). L'eix hipotàlem-hipòfisi-suprarenal (HHS) permet connectar l'hipotàlem amb la cortesa suprarenal, el pèptid CRH és l'encarregat de regular l'activitat de l'eix HHS, ja que controla la secreció de corticotropina o adenocorticotropina (ACTH) per part de la hipòfisi anterior, la qual estimula la secreció de glucocorticoides per part de la cortesa suprarenal, per exemple el cortisol. Per altre banda, el sistema nerviós simpàtic (SNS) juga un paper important en l'augment de l'alliberació d'adrenalina i noradrenalina per part de la medul·la suprarenal (Fernandez, 2010). D'aquesta manera, la secreció de CRH, noradrenalina i glucocorticoides durant la resposta a l'estrès, tenen un efecte directe damunt components que regulen el nivell d'activació (Chrousos, 2007). Tot i així, l'estrès és un terme molt ampli que encara crea confusió, però es pot intentar definir com la resposta multisistèmica del cos davant un canvi que desafia la seva integritat homeostàtica (Day, 2005).

Els efectes de l'estrès en la son poden ser diferents segons la naturalesa i intensitat de l'estímul, el temps i la durada de l'aplicació, i la tensió o la vulnerabilitat individual a l'estrès (Revel et al., 2009). Durant la resposta a un estímul de naturalesa psicològica, com és la immobilització, els animals romanen desperts la major part del temps a causa de la situació estressant (Bonnet et al., 1997). En canvi, els estímuls olorosos poden influir als cicles de son-vigília, ja sigui tenint propietats sedants o



estimulants. Els rosegadors són animals macro-osmòtics, per tant les olors són una font important de informació per a determinar diferents situacions de la seva vida, com puguin ser la presència de menjar o de depredadors (Velluti, 1997). S'ha demostrat que les rates exposades a l'olor dels depredadors mostren comportaments pronunciats, endocrins i neurals. Les respostes conductuals inclouen l'evitació de l'estímul, la locomoció detinguda, la vigilància, l'amagatall i l'enfocament cautelós cap a l'estímul (Dielenberg et al., 2001).

### **I.5. Estrès i ritmes activitat-repòs en humans**

A partir d'estudis realitzats aquests darrers anys, s'ha pogut observar una relació entre l'estrès i la falta de son, sobretot a països desenvolupats, els ciutadans dels quals duen una vida caòtica i sense horaris o, no cuiden bé els seus hàbits de dormir. L'estrès és, una de les principals causes d'insomni ocasional (agut), amb un 80% d'afectats per aquesta causa, mentre que només un 25% dels que pateixen insomni crònic és causat per l'estrès (Cano et al., 2008).

La societat moderna porta un ritme de vida caòtic, l'estrès constant i el fet de no respectar els horaris d'activitat i de descans, porten a una desincronització del ritme circadià i tenen efectes perjudicials per a la salut (Cano et al., 2008). Cada persona té uns horaris diferents, té horaris nocturns, fa feina de vespre, o fins i tot no té horaris fixes, a més s'ha prioritzat l'oci i la diversió enfront les hores de descans que tant necessita el nostre cos. A més de tot això, cada cop tenim ritmes de vida més estressants i això ens afecta de forma alarmant. Mantenir una bona higiene del son pot arribar a ser difícil en les societats modernes (Revel et al., 2009).

Les propietats restauratives del son depenen, tant de la durada com de la qualitat del mateix. La privació d'aquest comportament es tradueix en la pèrdua de rendiment en moltes tasques i un augment de la somnolència diürna (Bonnet, 1985).

Els trastorns de la son afecten a gran part de la població global, per a posar un exemple, el 23% dels espanyols pateixen insomni, res comparat amb el 56% de ciutadans estatunidencs afectats per aquest trastorn (Leger et al., 2008). Trastorns humans associats a l'estrès com l'ansietat, causen pertorbacions secundàries de la son (Arborelius et al., 1999). Amb el deteriorament de la capacitat de dormir, es provoca somnolència diürna i disfunció mental, podent causar problemes sanitaris i socioeconòmics. Uns dels trastorns de la son més importants són, entre d'altres, l'insomni, la narcolèpsia, el síndrome de les cames inquietes, l'apnea del son i els trastorns del ritme circadià (Revel et al., 2009). L'insomni és el més comú i, per tant, el més estudiat. És caracteritzat per la dificultat de dormir, la dificultat de quedar-se dormit o d'aixecar-se al matí, i es tradueix amb un somni no restauratiu o de baixa qualitat, provocant un deteriorament significatiu del funcionament diürn (Billard i Bentley, 2004). Les principals conseqüències són: cansament, irritabilitat, incapacitat de concentració i manca d'energia (Roehrs i Roth, 2004). La prevalença d'insomni augmenta amb l'edat i està íntimament relacionada amb trastorns psiquiàtrics com la depressió (Lustberg i Reynolds, 2000).

L'insomni afecta negativament a moltes situacions de la vida quotidiana i sobretot, a l'àmbit físic i social, la capacitat de treballar de forma eficient i la qualitat de vida es veuen fortament perjudicades, per això, s'ha convertit amb un problema de salut pública amb fortes conseqüències socioeconòmiques (Zammit, 2007).

### **I.5. Estrès i ritmes activitat-repòs en la rata**

L'evolució de la relació depredador-presa que hi ha entre gats i rosegadors, ha dut a potenciar la sensibilitat a les senyals dels primers per a millorar els comportaments defensius dels segons. L'olor de gat els provoca un tipus d'ansietat semblant a la que tenim els humans quan estem preocupats per alguna cosa (Dielenberg i McGregor, 2001).

L'exposició a aquest tipus d'estrès per part d'un individu de forma desprotegida i sense escapatòria, augmenta de manera duradora el comportament semblant a l'ansietat, a més, els efectes sobre el comportament duren almenys tres setmanes després de l'estrès del depredador (Adamec i Shallow, 1993; Adamec, 1997). La resposta de les rates a l'olor de gat és immediata, profunda i duradora. Es produeix a pesar que aquestes rates de laboratori mai no han trobat un gat viu (Dielenberg i McGregor, 2001).

L'organització cíclica del somni varia dins i entre espècies. Les longituds de període de cada cicle de son REM-NREM augmenten amb la mida del cervell entre espècies (Datta i MacLean, 2007). En humans adults, el ritme circadià del somni sol ser monofàsic, mentre que en la rata és polifàsic. Els primers presenten una alternança de 4-6 cicles durant tota la nit entre son NREM i REM, mentre que en rates els cicles són més curts. Tot i que és lògic pensar que hi haurà alguna diferència de l'arquitectura del somni entre les dues espècies, les principals modificacions homeostàtiques, circadianes i neuroquímiques del son, són molt similars entre les dues espècies (Veasey et al., 2000).

Cano al l'any 2008 va utilitzar com a estímul estressant l'intercanvi de gàbia (estímul específic de l'espècie) i va observar que els animals comencen a patir fragmentació de la son i disminució d'aquesta 4 hores després de l'exposició a l'estímul. Les rates sotmeses al model (intercanvi de gàbies) mostren tant una hiperactivitat fisiològica (activació d'àrees cerebrals dels sistemes autonòmic i d'alerta) com cognitiva (hiperactivació de l'escorça cerebral que produeix activitat EEG d'alta freqüència durant el son, així com el augment de l'expressió de FOS). Aquests resultats són coherents amb les dades obtingudes en estudis quantitius d'activitat EEG i en estudis de neuroimatge en pacients amb insomni).

## II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Amb el present projecte es pretén estudiar la relació entre l'exposició d'un grup d'individus de rates de la raça wistar a un estímul estressant i el seu efecte damunt els cicles d'activitat-repòs.

Com a base del nostre estudi es va utilitzar el treball realitzat Cano et al l'any 2008, al qual van utilitzar com a estímul estressant l'intercanvi de gàbia (estímul específic de l'espècie) per a observar les àrees del cervell que més s'estimulaven i veure la resposta fisiològica de l'individu. Van incloure factors variants i van estudiar una sèrie de característiques com la son amb l'ajuda d'un electroencefalograma (EEG), la temperatura, la immunohistoquímica, van presentar una caracterització dels anticossos primaris i un patró de la proteïna Fos mostrant els circuits d'activació de les diferents àrees del cervell. Per a poder realitzar aquestes proves, van extreure el cervell dels rosegadors unes 5.5 hores (h) després de l'intercanvi de gàbia, ja que es va observar que els animals comencen a patir fragmentació de la son i disminució d'aquesta 4 hores després de l'exposició a l'estímul.

Es va plantejar el Treball de Fi de Màster de Reyna (2018) com a continuació de l'estudi de Cano et al (2008) amb un estímul estressant conegut, prolongant el temps d'exposició fins a 24 hores per així estudiar el seu efecte en un període de temps més ampli. Es van analitzar les possibles alteracions dels ritmes d'activitat-repòs d'un grup d'individus durant tres setmanes, evidenciant així les alteracions del ritme circadià en la seva totalitat. Per a mirar-ho, es va presentar l'estímul estressant (introducció d'encenall brut d'altres mascles) i es va procurar un anàlisi de l'activitat que mostraven els individus durant tot el cicle de tres setmanes, gràcies a uns sensors infrarojos col·locats estratègicament.

A partir dels resultats extrets als estudis anteriors, es va realitzar un projecte similar, en el qual es va presentar un estímul estressant típic de l'espècie, la introducció d'encenall brut amb olor de gat (el seu depredador natural) durant un període de dues setmanes per a mirar l'efecte de l'estímul prolongat en el temps i no de forma puntual.

La hipòtesi del projecte proposa que l'exposició a un estímul estressant com ara excrements de *Felis catus* interferirà amb els zeitgebers de la rata (*Rattus norvegicus*), desincronitzant els ritmes d'activitat-repòs a individus adults.

Per això, l'objectiu principal de l'estudi és conèixer com es veuen influenciats els ritmes circadianis d'activitat-repòs a partir de l'exposició d'un grup d'individus a un estímul estressant conegut (olor de gat).

Es proposen els objectius secundaris següents:

- Comprovar que l'exposició d'un grup d'individus a un estímul estressant olorós provoca una alteració del seu ritme circadiari durant les hores de llum (repòs) y de foscor (activitat).
- Explorar si la resposta (augment o disminució de l'activitat) del animal a un estímul estressant està condicionada per el tipus d'estímul utilitzat.

- Comprovar si la resposta de les rates a l'olor de gat es produeix a pesar que aquestes rates de laboratori mai han trobat un gat viu.
- Treure conclusions rellevants per a comprendre i millorar les situacions d'estrès a humans.

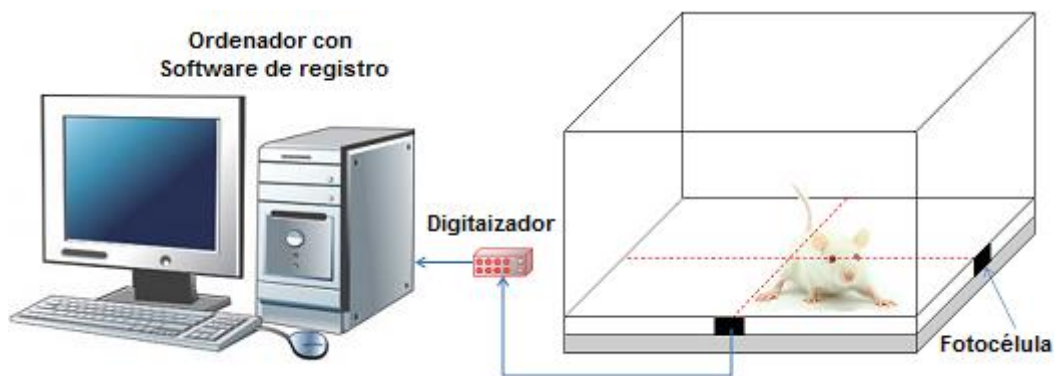
El interès del estudi d'estrès i dels ritmes d'activitat-repòs en la rata com model experimental, poden suposar un avanç per a la comprensió de la influència del estímuls estressants sobre la regulació dels ritmes circadianis i patologies associades a estos en humans .

### III. MATERIAL I MÈTODES

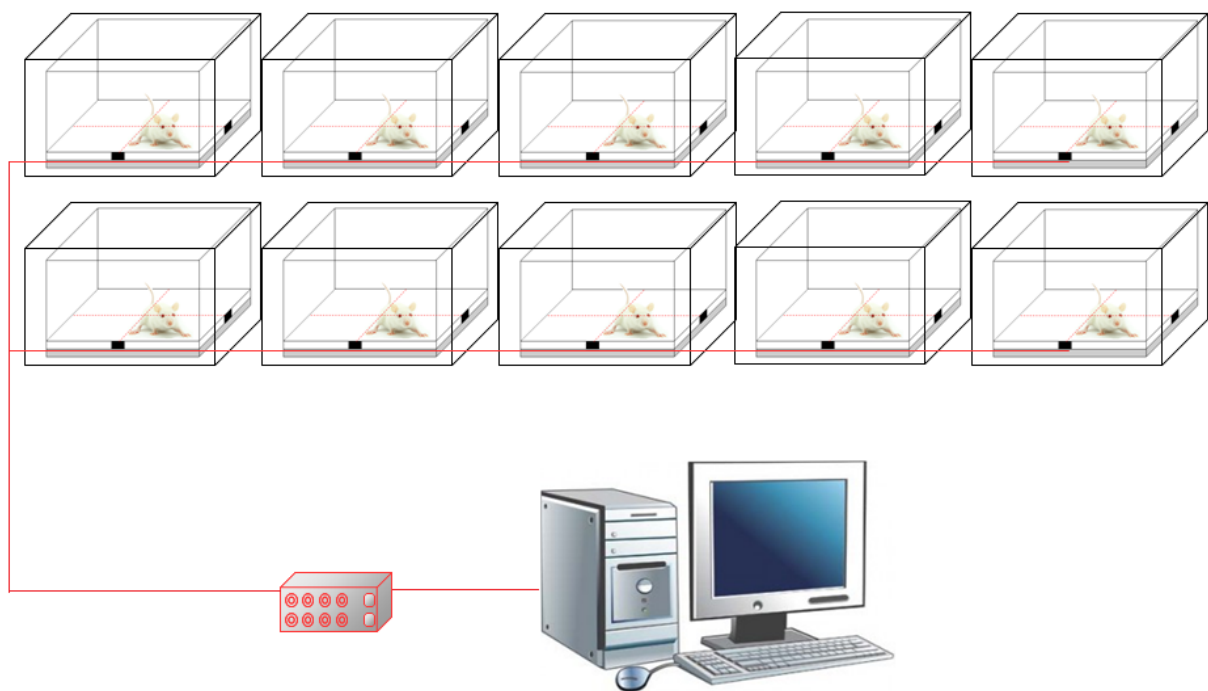
Per a la realització de l'experiment es van utilitzar 9 rates Wistar mascles de 9 mesos d'edat, amb un pes d'entre 300 i 500g, obtingudes de l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears on van ser criades de forma lliure de patògens i amb igualtat de condicions. Totes les proves experimentals varen ser aprovades per el comitè ètic i es van realitzar al laboratori de fisiologia animal de la U.I.B. durant un període de tres setmanes, la primera d'elles va ser d'habitució..

Els animals varen ser distribuïts en gàbies individuals dins d'una cambra amb condicions de temperatura i humitat, 22°C i 70% respectivament, i un ritme de llum-obscuritat de 12/12 (08 a 20h llum i de 20 a 08h obscuritat). Aquests condicions es van mantenir durant tot el període de experimentació que va començar el dia 12 de març i va acabar el dia 2 de abril, sent la primera setmana d'habitució a la cambra dels registres.

Les gàbies utilitzades van ser de policarbonat de 20 x 22 x 21cm dins uns marcs metàl·lics que presentaven sensors infrarojos fotoelèctrics o fotocèl·lules per a detectar el moviment dels rosegadors. La seva activitat s'enregistrà per mitjà de la interrupció de dos feixos de llum infraroja, automàticament, cada cop que un individu es movia s'enregistrava com un nombre el qual s'anava acumulant, gràcies a un digitalitzador connectat a un ordinador amb un software de registre (Figura 1A i 1B). El programa utilitzat va ser el DAS 24 V29 dissenyat per el grup de Cronobiologia de la Universitat de Barcelona. Si el rosegador no presentava activitat, el registre mostrava un 0. Els registres de llum, temperatura i activitat, es realitzaven en cicles d'un minut de durada aconseguint així un major nombre de dades a analitzar.



*Figura 1A. En el diagrama es representa la gàbia d'una rata proveïda d'un marc que posseeix els sensors de moviment (fotocèl·lules). El marc sensor es connecta, a través d'un digitalitzador, a l'ordinador amb el programari de registre*



*Figura 1B. En el diagrama es mostra la distribució de les gàbies dins de la cambra climàtica. Cadascuna de les gàbies està envoltada d'un marc sensor que registra el moviment de la rata. Al seu torn, els marcs sensors es connecten amb un digitalitzador que porta la informació a l'ordinador amb el programari de registre.*

L'experiment va començar amb la col·locació de encenall net a cada gàbia i es varen introduir les rates corresponents amb menjar i aigua. Cada matí, entre les 8:00 i les 10:00h, es canviava l'encenall amb un altre net. Es mantingueren aquestes condicions durant una setmana d'habitució sense aplicar cap tractament i sense registrar l'activitat del animals.

La setmana (S1) següent d'experiment es seguia amb el mateix procediment de l'intercanvi d'encenall, eliminant així el possible efecte estressant que esdevindria la manipulació de les rates. Es registrava l'activitat dels animals durant tota la setmana.

La setmana (S2), es va seguir el mateix procediment de les dues setmanes anteriors, però aquesta vegada l'encenall brut s'intercanvià amb encenall net mesclat amb excrements de *Felis catus*, simulant així l'estímul estressant que volem analitzar. En aquest cas, també es registrava l'activitat del animals durant tota la setmana.

Un cop recollides les dades de moviment gràcies als sensors infrarojos dels marcs de les gàbies, es va realitzar l'anàlisi estadística emprant el programa Origin<sup>®</sup>Pro8. Es va utilitzar el t-Test de mostres aparellades (*Paired Sample t-Test*) per a comparar l'activitat de la primera setmana (S1) i l'activitat de la segona setmana (S2) d'un mateix grup d'individus. L'activitat tant diürna com nocturna va ser analitzada. El nivell de significança per a totes les proves estadístiques va ser de 0,05.

#### IV. RESULTATS

Les dades obtingudes i analitzades posteriorment corresponen a l'activitat de les rates en cada minut en la durada total de l'estudi (2 setmanes). A excepció de la primera anàlisi (ritme circadià, no es van tenir en compte les dades registrades de 8 am a 10 am de cap dia ja que va ser el període de manipulació de la rata (canvi de gàbia, canvi d'encenall ...) i es creu que aquests canvis poguessin haver ocasionat estrès en les rates en cert grau. per tant, l'activitat que es va registrar en aquest període pot haver estat influïda per més d'un factor estressant, sent aquests no objecte d'aquest estudi.

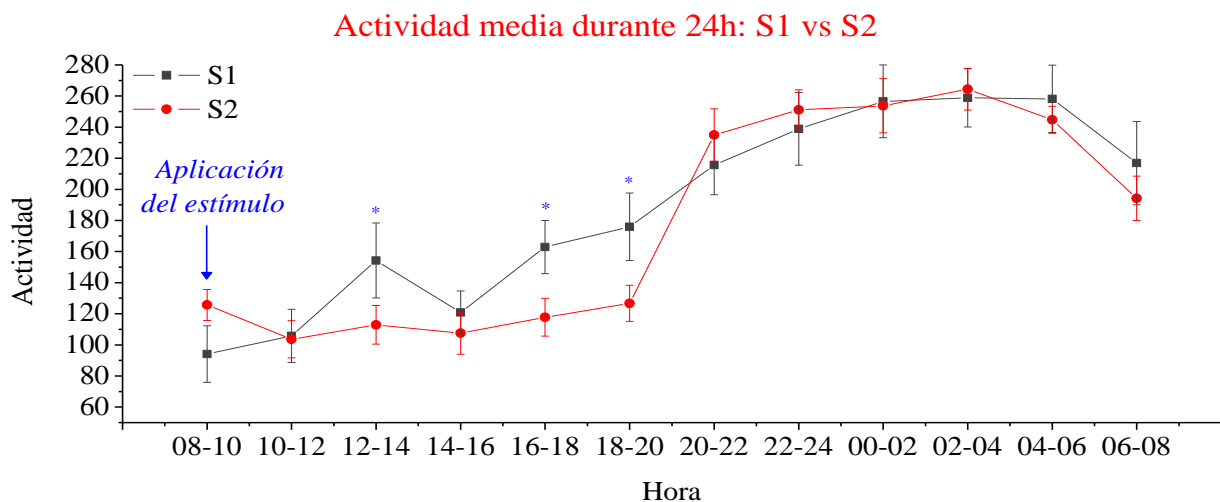


Figura 2A. Activitat mitjana del animals en les dues setmanes al llarg del dia (24h). S'observa el ritme circadiari d'activitat-repòs, veient l'activitat més baixa durant el període de dia (8 a 20h) i més elevada durant el període de nit (20 a 8 h), coincidint d'aquesta manera amb els cicles de llum fosc programats a la cambra climàtica. L'asterisc indica les diferències estadísticament significatives. Hi ha diferències en el període de 12-14 h, 16-18h i 18-20h entre la setmana 1 i la setmana 2.

Com era d'esperar, els individus van mostrar una corba d'activitat típica dels animals nocturns, poca activitat durant el dia i augment d'aquesta durant la nit.

Durant la S1, es va observar un augment gradual de l'activitat a les hores anteriors del període d'obscuritat [16-18h =  $162,873 \pm 51,337$ ; 18-20h =  $175,921 \pm 65,060$ ; 20-22h =  $215,492 \pm 56,967$ ], en canvi, durant la S2 observàrem un augment brusc d'aquesta a les 20h [18-20h =  $126,682 \pm 34,846$ ; 20-22h =  $234,905 \pm 50,485$ ], corresponent amb l'apagada dels llums. L'activitat diürna va ser menor durant la S2.

Cada dia durant la S2, de 8 a 10h del matí, es procedia a l'aplicació de l'estímul estressant (Figura 2A i 2B). Una davallada de l'activitat va ser observada durant les hores posteriors a l'aplicació

d'aquest, de fet, l'activitat diürna de la S1 va ser major que l'activitat de la S2, exceptuant les hores corresponents a l'aplicació de l'estímul, on  $S1 < S2$  (Figura. 2A i 2B).

Es varen observar diferències significatives de cara a l'activitat entre la S1 i la S2 a hores posteriors a l'aplicació de l'estímul: 12-14h, 16-18h, 18-20h ( $p$ -valors = 0,024; 0,026; 0,032; respectivament, *Paired Sample t Test*) (Taula 1).

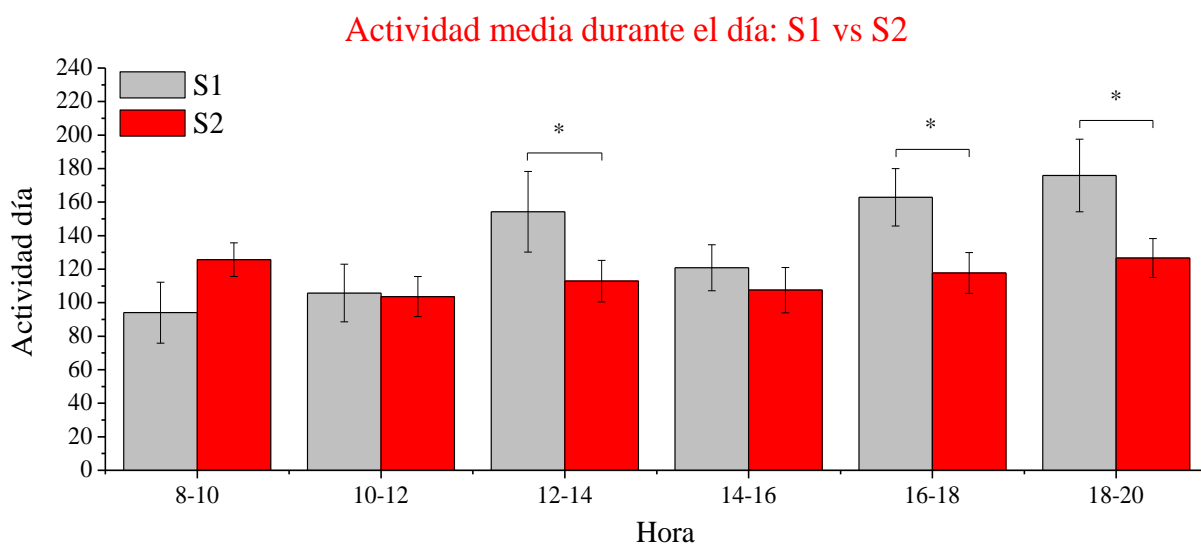


Figura 2B. Activitat mitjana del animals en les dues setmanes al llarg del dia (24h). S'observa el ritme circadiari d'activitat-repòs, veient l'activitat més baixa durant el període de dia (8 a 20h) i més elevada durant el període de nit (20 a 8 h), coincidint d'aquesta manera amb els cicles de llum foscor programats a la cambra climàtica. L'asterisc indica les diferències estadísticament significatives. Hi ha diferències en el període de 12-14 h, 16-18h i 18-20h entre la setmana 1 i la setmana 2.

HORA	SETMANA	N	MITJANA ± SD	SEM	Prob >  t
8-10h	S1	9	94,063 ± 54,605	18,202	0,051
	S2	9	125,682 ± 29,998	9,999	
10-12h	S1	9	105,778 ± 51,393	17,131	0,871
	S2	9	103,651 ± 35,799	11,933	
12-14h	S1	9	154,270 ± 72,231	24,077	0,024*
	S2	9	112,873 ± 37,188	12,396	
14-16h	S1	9	120,857 ± 41,245	13,748	0,202
	S2	9	107,507 ± 40,560	13,520	
16-18h	S1	9	162,873 ± 51,337	17,112	0,026*
	S2	9	117,746 ± 36,434	12,145	
18-20h	S1	9	175,921 ± 65,060	21,687	0,032*
	S2	9	126,682 ± 34,846	11,625	

Taula 1. Resultats estadístics corresponents a les dades diürnes del grup experimental. Nombre d'individus (N), desviació estàndard (SD), error estàndard (SEM),  $p$ -valor (Prob > |t|). \*  $p < 0,05$



A partir de la figura 3, es va poder observar que no hi havia una gran diferència de l'activitat en les hores nocturnes entre la S1 i la S2.

Els següents valors varen ser acumulats durant les hores nocturnes. Es va evidenciar que no hi havia diferències significatives entre aquests (Taula 2).

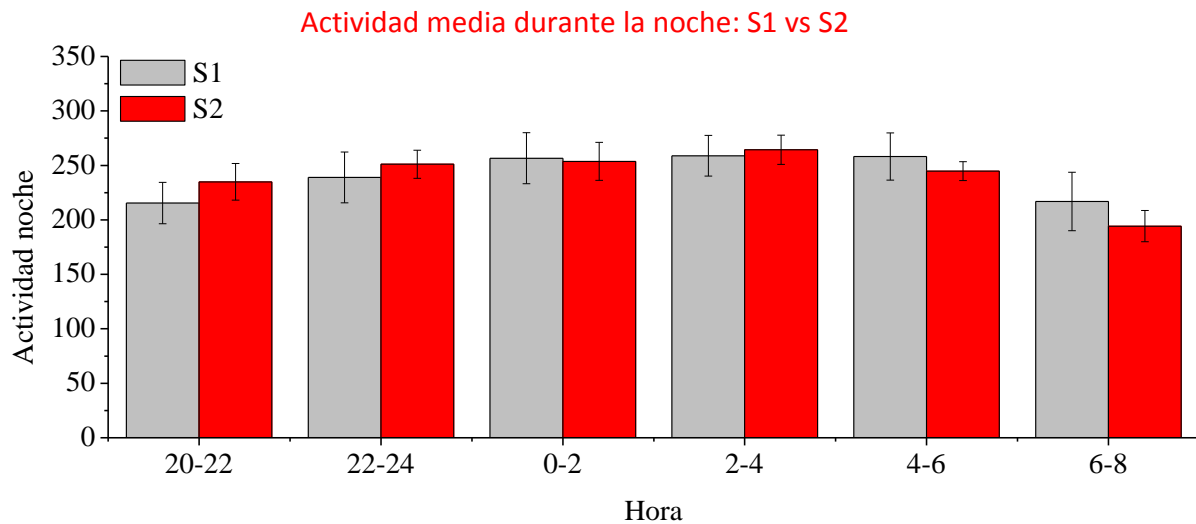


Figura 3.. Gràfic de barres corresponent a l'activitat mitjana de cada dues hores durant la nit (20 a 8h) del grup experimental. El color gris representa la S1 i el color vermell la S2.

HORA	SETMANA	N	MITJANA ± SD	SEM	Prob >  t
20-22h	S1	9	215,492 ± 56,967	18,989	0,314
	S2	9	234,905 ± 50,485	16,828	
22-24h	S1	9	238,905 ± 70,054	23,351	0,509
	S2	9	251,079 ± 38,602	12,867	
00-02h	S1	9	256,587 ± 70,134	23,378	0,870
	S2	9	253,714 ± 52,203	17,401	
02-04h	S1	9	258,809 ± 56,089	18,696	0,759
	S2	9	264,413 ± 40,343	13,448	
04-06h	S1	9	258,206 ± 64,989	21,663	0,462
	S2	9	244,682 ± 26,004	8,668	
06-08h	S1	9	216,841 ± 80,572	26,857	0,372
	S2	9	194,238 ± 42,935	14,312	

Taula 2. Resultats estadístics corresponents a les dades nocturnes del grup experimental. Nombre d'individus (N), desviació estàndard (SD), error estàndard (SEM), p-valor (Prob > |t|). \* p < 0,05

L'activitat mitjana diürna de la S1 va ser de  $143,940 \pm 29,483$  moviments, mentre que la nocturna va ser de  $240,807 \pm 20,468$  moviments (Taula 3). Els individus presentaven més activitat durant la nit, durant el dia presentaven el període de menys activitat (Figura 3).

Amb això, a la S2 es va poder observar una disminució de l'activitat durant les hores diürnes en comparació a la S1, mentre que a les hores nocturnes no es va poder distingir (Figura 3). Es varen

enregistrar  $113,692 \pm 9,013$  moviments durant les hores de dia, 30 moviments menys que la S1, mentre que durant les hores nocturnes se'n varen enregistrar  $240,505 \pm 24,687$ , quasi les mateixes que la S1.

Es varen trobar diferències significatives d'activitat entre les hores diürnes de la S1 i la S2 (p-valor = 0,033, *Paired Sample t Test*) (Taula 3).

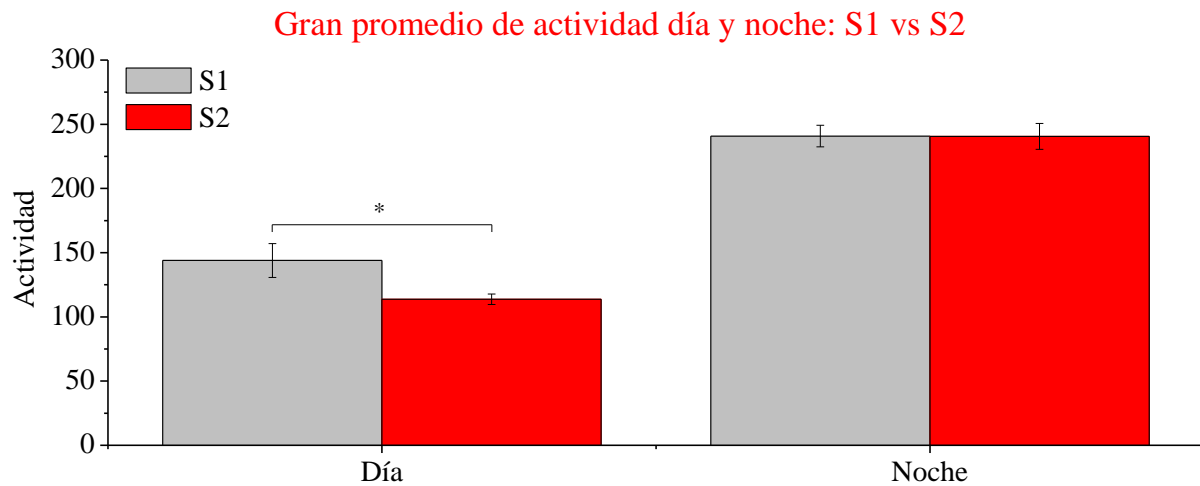


Figura 3. Gràfic de barres comparant l'activitat mitjana durant la S1 i la S2 del grup experimental. A l'esquerra l'activitat diürna (8 a 20h), a la dreta l'activitat nocturna (20 a 8h).

	SETMANA	N	MITJANA ± SD	SEM	Prob >  t
DIA	S1	5	143,940 ± 29,483	13,185	0,033*
	S2	5	113,692 ± 9,013	4,031	
NIT	S1	6	240,807 ± 20,468	8,356	0,965
	S2	6	240,505 ± 24,687	10,078	

Taula 3. Resultats estadístics corresponents a la gran mitjana diürna (DIA) i nocturna (NIT) del grup experimental. Nombre d'individus (N), desviació estàndard (SD), error estàndard (SEM), p-valor (Prob > |t|). N de DIA = 5, els valors acumulats entre les hores de manipulació (8-10h) varen ser eliminats. \*  $p < 0,05$

## V. Discussió

Els estudis realitzats per Cano et al (2008) i Reyna (2018) van ser claus per a la realització d'aquest projecte. A partir de les conclusions extretes en els seus treballs es va poder seguir estudiant els efectes de l'estrès sobre els ritmes circadianis dels animals.

En el cas de Cano, per a provocar la situació estressant varen utilitzar un estímul estressant psicològic específic de l'espècie, l'intercanvi de gàbies. Aquest tipus d'estímul produïa una resposta inicial d'estrès agut a les 2 hores de la seva aplicació, on els individus es mantenien en estat de vigília forçada però, al cap de 2 hores, es produïa una situació d'insomni agut molt similar a la patida per els humans amb insomni agut després d'una situació estressant, la qual derivava en pèrdua de la son i fragmentació d'aquesta. Per això, es va simular una situació d'estrès on l'estímul era generat per el context social, evitant les senyals olfactivas que ja tenen per mà i així, entendre la situació com una invasió del territori per part d'un individu de la mateixa espècie (Cano et al., 2008). Aquest fenomen es semblant al que pot patir un animal exposat a un canvi ambiental, en ambdós casos es sofreix un augment de la latència del son REM i NREM seguit d'una pèrdua de la quantitat de son REM i NREM (Tang et al., 2005a,b). El que es va traduir amb la disminució de les hores de son i un augment de l'activitat tant cerebral com motora durant les hores de repòs del grup experimental (Cano et al., 2008).

Pel que fa al treball de Reyna (2018), com estímul estressant es va introduir encenall brut, procedent de les gàbies d'altres mascles del grup control, dins les gàbies dels individus del grup experimental, simulant una situació semblant a la proposada per Cano. En aquest cas, es va poder veure un augment de l'activitat durant els dies d'exposició a l'estímul, tant a les hores de llum com d'obscuritat, evidenciant una influència de l'estímul estressant sobre els ritmes circadianis dels individus exposats, no tan sols durant les hores immediatament posteriors a l'estímul.

Amb l'exposició a estímuls estressants psicològics generats per el context social dels individus, es va poder veure un augment tant de l'activitat motora (Reyna, 2018) com de la cerebral (Cano et al., 2008). Al darrer estudi mencionat es va enregistrar l'electroencefalograma (EEG) i electromiograma (EMG), podent distingir entre l'estat de vigília i de repòs (dormir) encara que l'animal no presentés activitat motora, ja que l'activitat cerebral no és la mateixa en ambdós casos.

La resposta de les rates a l'olor de gat és immediata, profunda i duradora. Es produeix a pesar que aquestes rates de laboratori mai no han trobat un gat viu (Dielenberg i McGregor, 2001). Per això, al present estudi es va proposar un canvi del tipus d'estímul utilitzant l'olor d'un depredador típic dels rosegadors, intercanviant el factor social per el factor perill/depredació.

S'observa una disminució de l'activitat en els períodes de llum durant la S2, on es presenta l'estímul a partir de les 08.00h del matí (Figura 1), coincidint amb el començament de la fase lluminosa o repòs. Durant les dues primeres hores (8-10h) l'activitat de la S2 és major que l'activitat

de la S1, mentre que a la resta d'hores del matí passa el contrari, l'activitat de la S1 supera a la de la S2 (Figura 1).

A partir dels estudis realitzats per Blanchard et al (1989) es va començar a entendre la resposta de les rates a l'olor de gat. Es va arribar a distingir entre la resposta que produïa la presència del gat *in-situ* amb la que produïa només la seva olor, és a dir, quan el gat ja no hi era present. Durant la primera, la rata es retirava immediatament al cau i presentava una posició de congelació (*freezing*) acompanyada per l'emissió d'ultrasons. Mentre que en la segona situació, es retirava al cau però mostrant tot d'un patrons d'avaluació del risc. Predominava la posició amb el cap fora del cau (*head out*), amb vigilància i precaució sobre l'estímul (Blanchard i Blanchard, 1989). Aquest fet suggereix que la presència del gat provoca un "estímul complet del depredador" i una resposta de retir, mentre que l'olor de gat representa un "estímul parcial del depredador" i provoca incertesa (ansietat) (Dielenberg i McGregor, 2001).

El comportament observat en els individus del grup experimental durant la S2, que trobem representat a la figura 1, mostra una disminució de l'activitat motora durant les hores diürnes posteriors a l'aplicació de l'estímul. Altres autors han observat comportaments similars en base al mateix estímul proposat, amb la variant de l'espai on es realitzava l'experiment. Les gàbies dels rosegadors disposaven d'un amagatall o cau, on els individus podien protegir-se de l'amenaça persistent (Blanchard et al., 2001; Dielenberg i McGregor, 2001; Hubbard et al., 2004). S'ha vist, que els estímuls condicionats a una amenaça d'eficàcia innata (olor de gat), poden provocar diferents respostes defensives en base al context en el qual es trobi l'individu, si disposa d'amagatall o de mitjà per fugir, i del tipus d'estímul, ja sigui la presència del gat o només la seva olor (Blanchard et al., 2001).

Els subjectes estudiats no disposaven de cap amagatall o cau per a poder evitar l'estímul, ni de cap font emissora concreta de la qual sortís aquest. L'encenall on dormien havia estat en contacte amb femta de gat i n'era impossible la distinció d'un punt concret d'emissió. Aquest fet podria haver condicionat a les rates a l'hora de l'exposició a l'estímul, provocant un augment de la seva activitat per tal d'intentar evitar l'amenaça. Al tractar-se d'un "estímul parcial del depredador", pot provocar ansietat i una necessitat de recollir informació per a avaluar el grau d'exposició a l'amenaça (Dielenberg i McGregor, 2001).

Poques hores més tard, presenten una baixada de l'activitat. Els individus, un cop avaluada la situació assegurant-se que no hi ha presència del depredador i sense capacitat d'escapar, disminueixen l'activitat motora i augmenten la resposta defensiva de congelació i evitació (Blanchard et al., 2001). Durant les hores nocturnes, al no haver-hi el gat present i, passades unes 12h després de l'exposició a l'estímul, presentaven una activitat similar a la S1. Possiblement per a complir amb les seves necessitats biològiques de menjar, beure i defecar, i per el fet de disposar d'un espai limitat i únic on realitzar les diferents activitats. Si es disposés d'un cau dins la gàbia, la resposta de quedar-se dins i no sortir al lloc on l'estímul és més fort, seria la més fàcil i biològicament "adequada" per a la

supervivència. Tot i així, la necessitat d'anar a la zona conflictiva per a menjar i beure provoca la sortida del cau (Blanchard et al., 2001).

S'han descrit altres metodologies per a comparar diferents tipus d'olors relacionats amb depredadors dels rosegadors, com ara les guineus (Dickman, 1992; Blanchard et al., 2001; Dielenberg i McGregor, 2001; Revel et al., 2009). S'ha vist que el comportament resultant d'ambdós estímuls pot actuar de repel·lent de la rata, ja que els subjectes presentaven una falta d'aproximació a la font de l'olor, quasi l'evitaven. De tota manera, només l'olor de gat provocava comportaments defensius específics, com ara *head out* i una profunda inhibició de l'activitat motora (Dielenberg i McGregor, 2001).

## VI. Conclusions

1. L'exposició d'un grup d'individus a un estímul estressant olorós provoca una alteració del seu ritme circadià durant les hores de llum o repòs.
2. Els individus analitzats han mostrat una disminució de l'activitat motora i un augment de la resposta defensiva de congelació i evitació durant la setmana d'exposició a l'estímul estressant (S2).
3. La resposta a un estímul estressant està condicionada per el tipus d'estímul utilitzat. Un estímul que utilitza el factor social (prové de la mateixa espècie) provoca un augment de l'activitat, mentre que un estímul amb un factor perill/depredació (prové d'un depredador) provoca una disminució de la mateixa.
4. La resposta de les rates a l'olor de gat es produeix a pesar que aquestes rates de laboratori mai no han trobat un gat viu.
5. Només l'olor de gat provoca comportaments defensius específics, com ara una profunda inhibició de l'activitat motora.
6. El model animal utilitzat a aquest estudi no té aplicació per a estudiar l'arquitectura del somni relacionada amb l'insomni, però sí per a l'ansietat experimentada per humans en situacions d'estrès.

## VII. Referències

- Adamec RE, Shallow T.** (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & behavior*, *54*(1), 101-109.
- Adamec RE, Blundell J, Burton P.** (2005). Neural circuit changes mediating lasting brain and behavioral response to predator stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(8), 1225-1241.
- Adamec R.** (1997). Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense—Implications for understanding anxiety following traumatic stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 755-765.
- Ángeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado R, Escobar C.** (2007). Cronobiología médica: Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med UNAM*, *50*(6), 238-41.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB.** (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *Journal of endocrinology*, *160*(1), 1-12.
- Aschoff J.** (1964). Survival value of diurnal rhythms. *Symp Zool Soc Lodon* 1964; 13:79-98.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U.** (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* *93*, 929–37.
- Barriga-Ibars C, Rodríguez-Moratinos AB, Esteban S, Rial R.** (2005). Interrelaciones entre el sueño y el estado inmune. *Rev Neurol*, *40*(9), 548-556.
- Billiard M, Bentley A.** (2004). Is insomnia best categorized as a symptom or a disease *Sleep Medicine*, *5*, S35-S40.
- Blanchard RJ, Blanchard DC.** (1989). Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *13*, S3-S14.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Hori K.** (1989). *An ethoexperimental approach to the study of defense*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Blanchard RJ, Yang M, Li CI, Gervacio A, Blanchard DC.** (2001). Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*(7-8), 587-595.
- Bonmatí MA, Argüelles R.** (2015). La luz en el sistema circadiano. *Revista Eubacteria. Especial de Cronobiología*, 2015; N° 33, 9-15.
- Bonnet C, Leger L, Baubet V, Debilly G, Cespuglio R.** (1997). Influence of a 1 h immobilization stress on sleep states and corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP or ACTH18–39, Ph-ACTH18–39) brain contents in the rat. *Brain research*, *751*(1), 54-63.
- Bonnet MH.** (1985). Effect of sleep disruption on sleep, performance, and mood. *Sleep*, *8*(1), 11-19.
- Borbely AA.** (1982). A two-process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1982; 1:195-204.
- Brown SA, Azzi A.** (2013). Peripheral circadian oscillators in mammals. *Handb. Exp. Pharmacol.* 45–66.

- Cano G, Mochizuki T, Saper CB.** (2008). Neural circuitry of stress-induced insomnia in rats. *Journal of Neuroscience*, 28(40), 10167-10184.
- Cassone VM, Speh JC, Card JP, Moore RY.** (1988). Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 3, 71–91.
- Chrousos GP.** (1995). The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England Journal of Medicine*, 332(20), 1351-1363.
- Chrousos GP.** (2007). Organization and integration of the endocrine system: the arousal and sleep perspective. *Sleep Medicine Clinics*, 2, 125-145.
- Datta S, MacLean RR.** (2007). Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(5), 775-824.
- Day TA.** (2005). Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), 1195-1200.
- DeCoursey PJ, Krulas JR, Mele G, Holley.** (1997). Circadian performance of suprachiasmatic nuclei \_ Lesioned antelope ground squirrels in a desert enclosure. *Physiol Behav* 1997; 62:1099-108.
- Dielenberg RA, Carrive P, McGregor IS.** (2001). The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects I. *Brain research*, 897(1-2), 228-237.
- Dielenberg RA, McGregor IS.** (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 597-609.
- Dickman CR.** (1992). Predation and habitat shift in the house mouse, *Mus domesticus*. *Ecology*, 73(1), 313-322.
- Fernández Mendoza JJ.** (2010). *Insomnio crónico: subtipos basados en hallazgos polisomnográficos, psicopatológicos y neuropsicológicos* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- Golombek DA, Rosenstein RE.** (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90(3), 1063-1102.
- Granada AE, Cambras T, Díez-Noguera A, Herzog H.** (2010). Circadian desynchronization. *Interface Focus*, rsfs20100002.
- Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ.** (2007). La melatonina. *Investigación y ciencia*. 2007 Oct; 373: 30-8.
- Hubbard DT, Blanchard DC, Yang M, Markham CM, Gervacio A, Chun L, Blanchard RJ.** (2004). Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. *Physiology & behavior*, 80(4), 525-530.
- Leger D, Poursain B, Neubauer D, Uchiyama M.** (2008). An international survey of sleeping problems in the general population. *Current medical research and opinion*, 24(1), 307-317.
- Lobato A.** (2015). La melatonina más allá del ritmo circadiano. Trabajos Fin de Grado Uva.

- Lustberg L, Reynolds CF.** (2000). Depression and insomnia: questions of cause and effect. *Sleep medicine reviews*, 4(3), 253-262.
- Madrid JA, Rol MA.** (2015). Ritmos, Relojes y relojeros. Una introducción a la Cronobiología. *Revista Eubacteria. Especial de Cronobiología*, 2015; N° 33, 1-8.
- Moberg GP.** (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*, 1-21.
- Most EI, Scheltens P, Van Someren EJW.** (2010). Prevention of depression and sleep disturbances in elderly with memory-problems by activation of the biological clock with light – a randomized clinical trial. *BioMed Central*, 11-19.
- Ortiz-Tudela E, Madrid JA, Rol MÁ.** (2014). Técnicas de estudio del sistema circadiano humano, in: *Tratado de Medicina Del Sueño*. pp. 1–8.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R.** (2006). Melatonin, nature's most versatile biological signal. *FEBS J.* 2006 Jul; 273 (13): 2813-38.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N.** (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008; 85:335–53.
- Revel FG, Gottowik J, Gatti S, Wettstein JG, Moreau JL.** (2009). Rodent models of insomnia: a review of experimental procedures that induce sleep disturbances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(6), 874-899.
- Reyna ME.** (2018). *Interacciones entre el estrés, los ritmos de actividad-reposo y los zeitgebers en la rata* (Treball de Fi de Màster no publicat). Universitat de les Illes Balears, Mallorca.
- Rial RV, Akaarir M, Gamundi A, Nicolau MC, Esteban S.** (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. *Neurosc and Biobehav Rev.* 2010; 34:11 44-60.
- Roehrs T, Roth T.** (2004). Sleep disorders: an overview. *Clinical cornerstone*, 6(1), S6-S16.
- Slat E, Freeman GM, Herzog ED.** (2013). The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 105–23.
- Swaab DF, Fliers E, Partiman TS.** (1985). The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res.* 342, 37–44.
- Tang X, Liu X, Yang L, Sanford LD.** (2005). Rat strain differences in sleep after acute mild stressors and short-term sleep loss. *Behavioural brain research*, 160(1), 60-71.
- Tang X, Xiao J, Parris BS, Fang J, Sanford LD.** (2005). Differential effects of two types of environmental novelty on activity and sleep in BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Physiology & behavior*, 85(4), 419-429.
- Tosini G, Menaker M.** (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419–21.
- Veasey SC, Valladares O, Fenik P, Kapfhamer D, Sanford L, Benington J, Bucan M.** (2000). An automated system for recording and analysis of sleep in mice. *SLEEP-NEW YORK-*, 23(8), 1025-1042.



**Velluti R.** (1997). Interactions between sleep and sensory physiology. *Journal of sleep research*, 6(2), 61-77.

**Zammit GK.** (2007). The prevalence, morbidities, and treatments of insomnia. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 6(1), 3-16.