

Artículo de Investigación

Una feromona de alarma produce reacción de congelamiento después de una sola exposición

An alarm pheromone produces freezing response after a single exposure

Manuel Saldaña-Aguado¹, Ana G. Gutiérrez-García^{2*} y Carlos M. Contreras^{2,3}

¹Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Centro de Investigaciones Cerebrales. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México; ²Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México; ³Unidad Periférica-Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Xalapa, Veracruz.

Recibido: 26 de noviembre de 2019

Aceptado: 16 de febrero de 2020

Puedes encontrar este artículo en: www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2020/26/26.html

Resumen

Los sistemas sensoriales permiten integrar estímulos y evocar respuestas ante situaciones de amenaza o peligro para favorecer la supervivencia. La 2-heptanona es una feromona de alarma identificada en varias especies y su acción se establece de inmediato, provocando reacciones de evitación y de huida. Dado que se desconoce su acción en el largo plazo, el objetivo de este estudio fue evaluar las conductas desplegadas por ratas macho ($n=24$) en el laberinto de brazos elevados (LBE), en la prueba de enterramiento defensivo (ED) y en la prueba de campo abierto (CA). Usamos 3 grupos de ratas, un grupo fue expuesto a estimulación olfativa mediante un flujo de 1.5 l/min de aire impregnado con 3 μ l de 2-heptanona. Otro grupo fue sometido a estrés mediante estímulos auditivos impredecibles (4 kHz, 75 dB). Un tercer grupo se empleó como control (sin estimulación sensorial). Las pruebas conductuales se realizaron 24 horas después de la estimulación sensorial. La exposición a 2-heptanona incrementó el tiempo de permanencia en brazos cerrados en el LBE ($p<0.05$) una reacción considerada ansiosa y el congelamiento en el ED ($p<0.05$), una respuesta adaptativa. No se encontraron diferencias en CA. La estimulación auditiva no produjo efectos conductuales observables 24h después de la exposición. En conclusión, la 2-heptanona permite la expresión de un comportamiento adaptativo para afrontar situaciones de amenaza, mediante el congelamiento lo que permite ser menos detectable por posibles predadores. La aptación, es que tal conducta ocurre aún 24h después de la exposición.

Palabras clave: Miedo, Ansiedad, Congelamiento, 2-heptanona, Sistema olfativo.

Abstract

Sensory systems allow individuals to integrate stimuli and evoke responses in situations of threat or danger to favor survival. 2-heptanone is an alarm pheromone that has been identified in different species and its effect is immediately, producing avoidance and flight reactions. However, long term effects of this compound remain unknown. The aim of present study consists on determine and compare the long-term actions of this compound with auditory stimulation. We evaluated the behaviors displayed by male rats ($n=24$) in the elevated plus maze, the defensive burying test and in the open field test, 24h after exposure. We used 3 groups of rats: one group was exposed to olfactory stimulation by a constant flow of 1.5 l/min of 3 μ l 2-heptanone impregnated air. Another group was exposed to stress, using unpredictable auditory stimuli (4 kHz, 75 dB), a third group was used as control (without sensory stimulation). The behavioral tests were performed 24h after sensory stimulation. The 2-heptanone olfactory exposure increased the time spent in closed arms during the elevated plus maze ($p<0.05$), an anxiety like reaction, and freezing during the defensive burying test ($p<0.05$), an adaptative response. We did not observe differences in the open field test. No measurable behavioral effects were shown by the auditory stimulation group 24h after exposure. In conclusion, 2-heptanone allows the expression of an adaptative behavior to face a threatening situation by freezing, what makes subjects to be less detectable to predators, this response lasts more than 24h after exposure.

Keywords: Fear, Anxiety, Freezing, 2-heptanone, Olfactory system.

* Correspondencia: Ana G. Gutiérrez García. Av. Dr. Luis Castelazo s/n., Industrial Las Animas, Xalapa, Veracruz, 91190, México. Teléfono: +55 228 8418900 Ext. 13613. Fax: +55 228 8418920. E-mail: angutierrez@uv.mx

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



I. Introducción

Los sistemas sensoriales tienen un alto grado de conservación filogenética en mamíferos. Permiten desde la detección de alimentos hasta la detección y distinción entre un medio seguro y otro peligroso.¹ En los vertebrados, el sistema olfativo se encuentra conformado por el sistema olfativo principal y el sistema olfativo accesorio o vomeronasal. Aunque se trata de sistemas interrelacionados, el sistema olfativo principal está relacionado principalmente con la detección de olores que se encuentran en el ambiente. Por su parte, el órgano vomeronasal detecta principalmente feromonas, es decir, componentes químicos secretados por un individuo y que al ser detectados por otro individuo de la misma especie producen cambios conductuales en este último.²

La información captada por los receptores olfativos del sistema olfativo accesorio se dirige hacia la amígdala principalmente al núcleo medial, de cuya actividad se deriva la modulación del miedo generado por olores de depredadores.³ Estas conexiones junto con sus proyecciones hacia el núcleo lateral de la amígdala y con el hipocampo permiten que el sujeto responda adecuadamente a los estímulos olfativos, generando estrategias conductuales de supervivencia.⁴ En paralelo, las proyecciones hacia la estría terminal y el hipotálamo, integran respuestas endocrinas y autónomas.⁵ Finalmente, entran en acción las áreas motoras corticales y subcorticales, de donde se elabora la respuesta motora dependiente del tipo de sustancia odorífera detectada.⁶

Los estímulos auditivos, por su parte, son captados y transmitidos desde el oído externo y medio a las células ciliadas del órgano de Corti en la porción coclear del oído interno, las fibras nerviosas de las células ciliadas conectan con el nervio auditivo y llegan al núcleo coclear a nivel del bulbo raquídeo.⁷ Desde el núcleo coclear los axones siguen un trayecto ascendente hacia el complejo olivar superior, haciendo una decusación en la porción ventral del puente. El complejo olivar superior, es importante para detectar la diferencia de tiempo interaural necesario para la localización del sonido.⁸ Posteriormente, desde el complejo olivar superior se envían proyecciones al colículo inferior donde se lleva a cabo la integración de la información auditiva binaural.⁹ El colículo inferior

recibe también proyecciones del núcleo basal de la amígdala, siendo esta vía necesaria para la activación de la amígdala por estimulación auditiva aversiva.¹⁰ Los axones procedentes del colículo inferior conectan con el núcleo geniculado medial, su relevo talámico, y finalmente llega la corteza auditiva.¹¹

En cualquier caso, estos sistemas permiten al individuo integrar estímulos sensoriales y generar respuestas a situaciones de amenaza o peligro.¹² Estas respuestas pueden optimizarse mediante la memoria emocional, un proceso por el cual el cerebro configura el modo de crear recuerdos sobre cada fenómeno emocional básico y significativo, permitiendo que el individuo reconozca señales de su entorno y las compare con experiencias pasadas, como un elemento de juicio para responder eficazmente a su entorno, mediante la elección de la mejor estrategia.¹³ La estimulación olfativa con 2-heptanona, produce acciones en estructuras relacionadas con la memoria emocional que duran al menos 72h,¹⁴ mientras que el efecto conductual de los estímulos auditivos impredecibles y aversivos producen cambios conductuales, de inmediato¹⁵ y aparentemente desaparecer en poco tiempo. En cambio, la estimulación olfativa, en particular con la 2-heptanona puede producir cambios conductuales de mayor duración, y aún en ausencia del estímulo que les dio origen. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos sobre la conducta de dos estímulos sensoriales para los que ya ha sido demostrada su acción inmediata, bajo la hipótesis de que en el ambiente de un roedor prevalecen los estímulos olfativos, los cuales son empleados por sus conoespecíficos como señales que indican peligro, por eso son llamadas sustancias de alarma, en cuyo caso los efectos de estas sustancias de alarma deberán ser más perdurables que los de una estimulación auditiva y que este estímulo olfativo puede producir reacciones conductuales defensivas innatas.

La 2-heptanona es un compuesto cetónico que actúa como sustancia de alarma, fue encontrada primero en insectos y luego en mamíferos.¹⁶ La concentración urinaria de esta cetona incrementa cuando las ratas son sometidas a estrés físico, de acuerdo con los indicadores de ansiedad recabados en la prueba de enterramiento

defensivo.¹⁷ Además, la 2-heptanona incrementa la tasa de disparo (número de potenciales de acción por unidad de tiempo) en las neuronas de la amígdala basal,¹⁸ una de las estructuras del lóbulo temporal relacionadas con las respuestas al miedo en ratas con órgano vomeronasal intacto, por lo cual se ha sugerido que esta activación está relacionada con un aumento de los niveles de ansiedad que preparan al individuo a afrontar una situación de peligro. Por otra parte, estímulos auditivos temporalmente impredecibles, son suficientes para provocar un aumento en la actividad de la amígdala, especialmente en los núcleos basal y lateral, produciendo conductas parecidas a la ansiedad.¹⁵ La 2-heptanona es una feromona de alarma, pero se desconoce el tipo de respuesta conductual que pueda relacionarse con una situación de alarma y si esta acción aparece en el largo plazo.

2. Materiales y métodos

La manipulación de los sujetos experimentales siguió estrictamente los acuerdos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)¹⁹ y los lineamientos del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2.1. Animales y condiciones de alojamiento

Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Wistar, de tres meses de edad, con un rango de peso entre 300-350 g. Se alojaron en cajas de acrílico transparentes con medidas de 45 x 33 x 30 cm, con una cama de 5 cm de aserrín. Se mantuvieron en un bioterio a temperatura ambiente (25° C) y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 horas (7:00 am a 7:00 pm) con agua y alimento (Harlan 2018S Teklad Lab Animal Diets, Indianapolis, IN, USA) para roedor ad libitum.

2.2. Grupos experimentales

Las ratas fueron asignadas a tres grupos experimentales: Grupo Control (sin estímulos, n= 8), Grupo Sonido (estimulación auditiva, n= 8)

y Grupo 2-heptanona (estimulación olfativa con 2-heptanona, n= 8).

2.3. Tratamientos

La estimulación olfativa, se realizó con la liberación de un flujo constante de 1.5 l/min de aire impregnado con 3 µl de 2-heptanona (Cat. 537683, Sigma-Chemical, St. Louis, Mo., USA) a través de una bomba de aire (Resun, Xalapa, México). La 2-heptanona fue colocada en un tubo de ensayo, conectado a una cánula de polietileno, con un diámetro interno de 0.022 cm y un diámetro exterior de 0.042 cm, cuyo extremo pasaba por debajo del piso de rejillas. Este aire impregnado se introdujo en una cámara cerrada (30 cm x 25 cm de base y 30 cm de altura) con barras de acero inoxidable (diámetro de 0.5 cm, con una separación entre una y otra barra de 1.3 cm). Esta cámara se introdujo en otra segunda cámara sonoamortiguada (56 cm de ancho, 46 cm de alto y 40 cm de fondo), de manera que las ratas fueron forzadas a inhalar el aire impregnado con la 2-heptanona durante 60 min.

Para la estimulación auditiva se empleó un amplificador (Mitsu PA-840) conectado a una bocina (Nidec Alpha VTM) en el interior de la caja sonoamortiguada idéntica a la empleada para la estimulación olfativa. Los estímulos fueron aplicados con una frecuencia de 4 kHz, a una intensidad de 75 dB, con duración variable (5–60s, con intervalos entre 10-300s), de manera aleatoria (opción aleatoria del equipo) durante 60 min.

2.4. Batería conductual

2.4.1. Laberinto elevado en cruz

Se utilizó un laberinto con dos brazos de madera abiertos (color blanco) y dos cerrados (color negro) en cruz. Las dimensiones de ambos brazos fueron de 50 cm de largo y 10 cm de ancho. Los brazos oscuros tienen paredes de 50 cm que los protegen. El laberinto tiene una altura de 50 cm sobre el suelo. La prueba duró 5 min. Todas las sesiones fueron videograbadas en una “minicámara” semiprofesional CCTV-135 a color Steren® sujeta en la parte superior del laberinto. La prueba comenzó al colocar a las ratas en el centro del laberinto, mirando hacia un brazo

abierto. Se evaluó el tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados, el número total de entradas a brazos abiertos y cerrados. Al término de cada sesión individual, el aparato fue desodorizado con una solución limpiadora conteniendo alcohol al 5 %. En caso de que una rata caiga del laberinto, se retira de la prueba y se descarta del análisis estadístico.

2.4.2. Enterramiento defensivo

Cada rata fue colocada en una caja de acrílico (27 × 17 × 15.5 cm), con un electrodo saliente de una de sus paredes (90 mm de longitud; 8 mm de diámetro) 2 cm por arriba de una capa de aserrín. El aserrín cubrió 5 cm de altura sobre la superficie de la caja. El electrodo fue conectado a un estimulador (Grass S-44 Quincy, Massachusetts, USA) acoplado en serie a una unidad de aislamiento (Grass Instruments SIU5) y luego a una unidad de corriente constante (Grass, Instruments CCUIA), proporcionando una corriente directa (0.3 mA). La prueba duró 10 minutos a partir de que la rata tocó el electrodo. Se evaluó la latencia al primer enterramiento, el tiempo acumulativo de enterramiento y el tiempo total de congelamiento. Las sesiones fueron videograbadas en un software Any-Maze (Stoelting Co., Canadá) y analizadas mediante un programa elaborado en lenguaje Pascal por uno de los autores CMC) que emplea tiempo real para permitir la captura de eventos en el tiempo. En el análisis estadístico solo se incluyeron los datos en los que los dos observadores independientes concordaron.

2.4.3. Actividad locomotriz

Se evaluó la actividad locomotriz durante 5 min a través de un sistema de monitoreo automatizado (Acti-Trackv2.7.10, PanLab, S.L., Instrument, Barcelona, España) conformado por una caja de Perspex (45 cm x 45 cm) con paredes de 35 cm de altura. Contiene un total de 32 leds

infrarrojos, 16 colocados en cada pared (3 cm por encima de la superficie del piso) que se conectan a una interface (LE 8811, LSI Letica Scientific instrument, Barcelona, España) y de ahí a una PC. El software permite realizar una división digitalizada del piso de la caja en cinco zonas (cuatro en la periferia y una central). En esta prueba se registraron variables como el tiempo que recorrió el animal en el centro y en la periferia, así como el número de veces que el animal cruzó a cada una de las cinco zonas que dividen el piso. Al término de cada sesión individual, el aparato fue desodorizado con una solución limpiadora conteniendo alcohol al 5%.

2.5. Procedimiento

En la primera sesión, las ratas fueron individualmente colocadas dentro de una caja de acrílico, durante 15 min sin estímulo alguno con fines de habituación, posteriormente se les aplicaron los respectivos estímulos: estimulación auditiva, estimulación olfativa, o ningún estímulo, durante 60 min. Después, la rata fue retirada a su bioterio de estancia. 24h después, las ratas pasaron a las pruebas conductuales: laberinto elevado en cruz, le siguió la prueba de enterramiento defensivo y después la prueba de actividad locomotriz. (Fig. 1).

2.6. Análisis estadístico

Para el análisis de las pruebas conductuales, se utilizó el programa de Graphpad versión 7 para Windows. Se empleó la prueba Kruskal Wallis para comparar los grupos en cada una de las variables evaluadas en la batería conductual. Se aplicó la prueba de Dunn's como prueba post hoc. Sólo se aceptaron como diferencias significativas, aquellas que alcanzaron $p \leq 0.05$. Como los datos no siguieron una distribución normal, se representan como la mediana y percentiles 25 y 75.

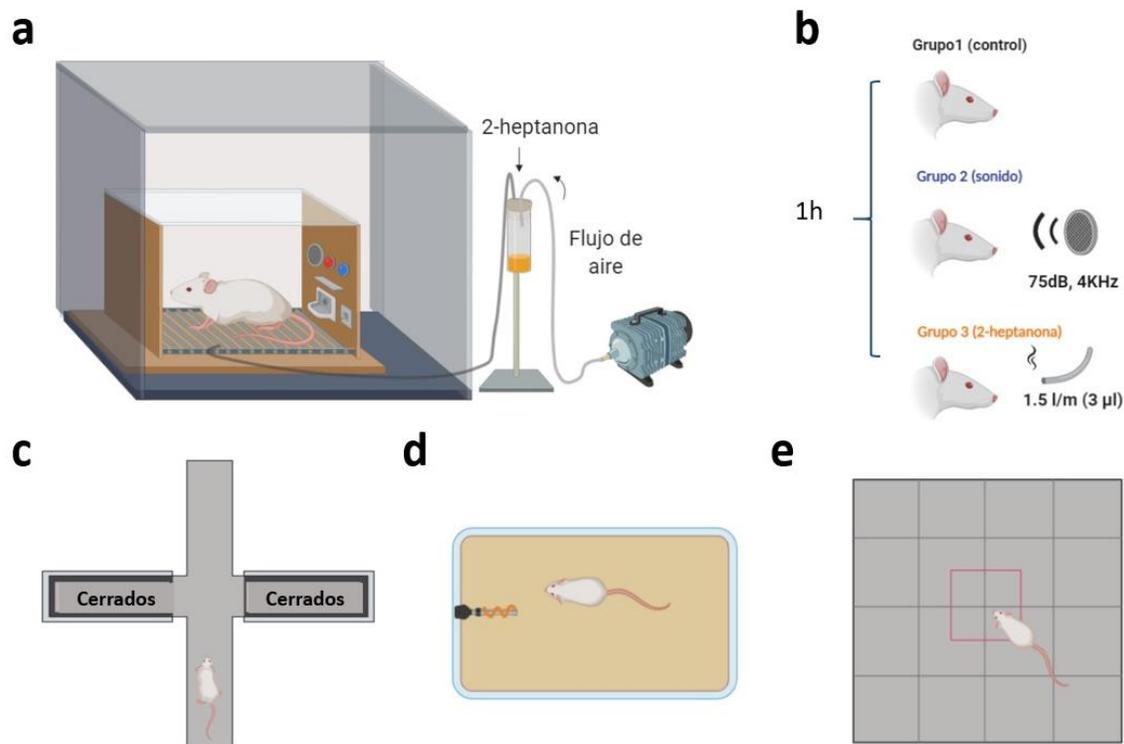


Fig. 1. Diseño experimental. a) Procedimiento general. Todos los sujetos fueron colocados en una caja de acrílico de 30 cm x 25 cm de base y 30 cm de altura, con un piso de rejilla. Esta caja fue a su vez colocada en el interior de una cámara sonoamortiguada (56 cm de ancho, 46 cm de alto y 40 cm de fondo) y se aplicaron los respectivos tratamientos: b) estimulación olfativa, estimulación auditiva, o ningún estímulo, durante 60 minutos. Después, la rata fue retirada a su bioterio de estancia. 24 horas después, se les colocó en las pruebas conductuales: laberinto elevado en cruz (c), seguido de la prueba de enterramiento defensivo (d) y, por último, en la prueba de actividad locomotriz (e).

3. Resultados

3.1. Laberinto elevado en cruz

No se encontraron diferencias significativas al comparar los 3 grupos en las variables evaluadas en el laberinto elevado en cruz: entradas a brazos abiertos [H= 5.597, 2 gl, $p = 0.060$], entradas a brazos cerrados [H= 2.150, 2 gl, $p = 0.341$], tiempo en brazos abiertos [H= 5.533, 2 gl, $p = 0.062$]. Se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos en la variable tiempo en brazos cerrados [H= 7.385, 2 gl, $p < 0.024$]. La prueba post hoc mostró que el grupo 2-heptanona pasó más tiempo en los brazos cerrados al compararlo contra el grupo control y grupo sonido ($p < 0.05$) (Fig. 2).

3.2. Enterramiento defensivo

No se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos en el tiempo acumulativo de enterramiento [H= 2.371, 2 gl, $p = 0.316$] y en la latencia al enterramiento [H= 0.317, 2 gl, $p = 0.864$]. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo de congelamiento al comparar los grupos [H= 12.62, 2 gl, $p < 0.001$]. La prueba post hoc mostró que el tiempo de congelamiento fue mayor ($p < 0.05$) en el grupo 2-heptanona comparado contra los grupos control y sonido (Fig. 3).

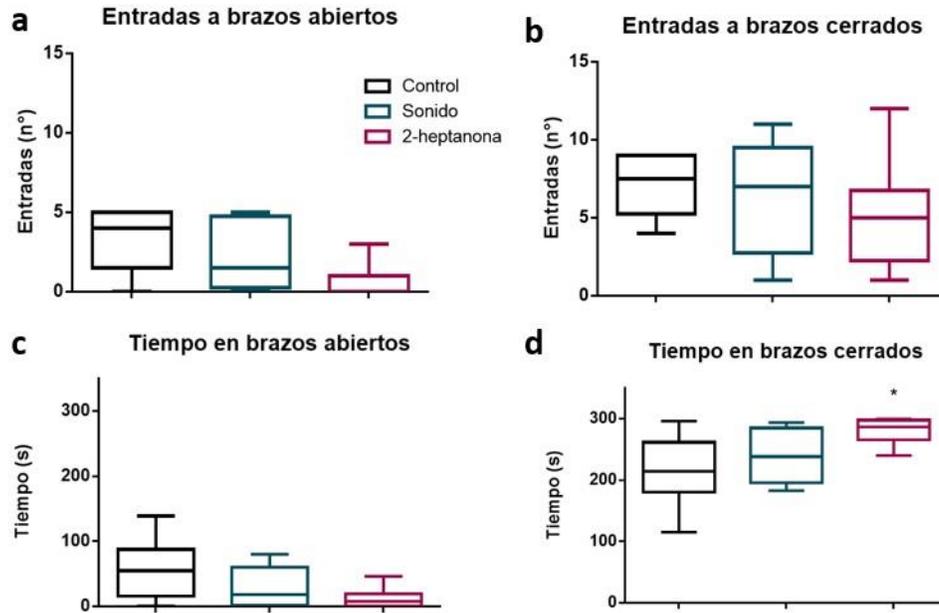


Fig.2. Laberinto de brazos elevados. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en las variables: entradas a brazos abiertos y a brazos cerrados (a, b) y tiempo en brazos abiertos (c). El grupo expuesto a 2-heptanona, pasó mayor tiempo en los brazos cerrados (d) al compararlo con los grupos control y sonido (* $p < 0.05$ Dunn's post hoc).

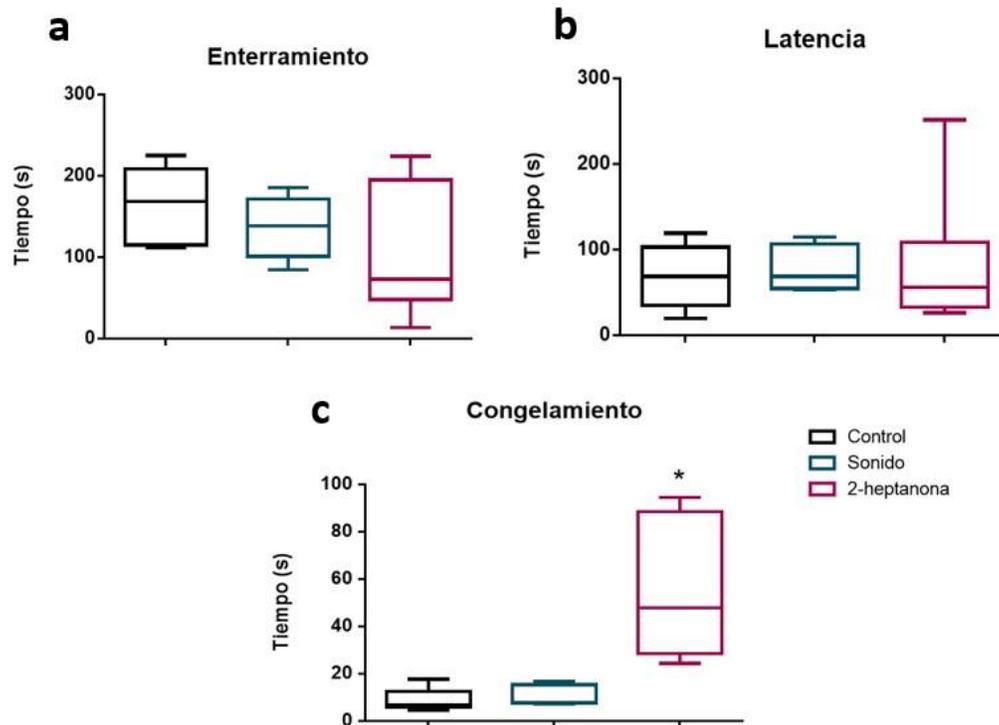


Fig.3. Prueba de enterramiento defensivo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el tiempo acumulativo de enterramiento (a) ni en la latencia (b). El grupo expuesto a la 2-heptanona mostró mayor tiempo en congelamiento (c) comparado con los grupos control y sonido (* $p < 0.05$ Dunn's post hoc).

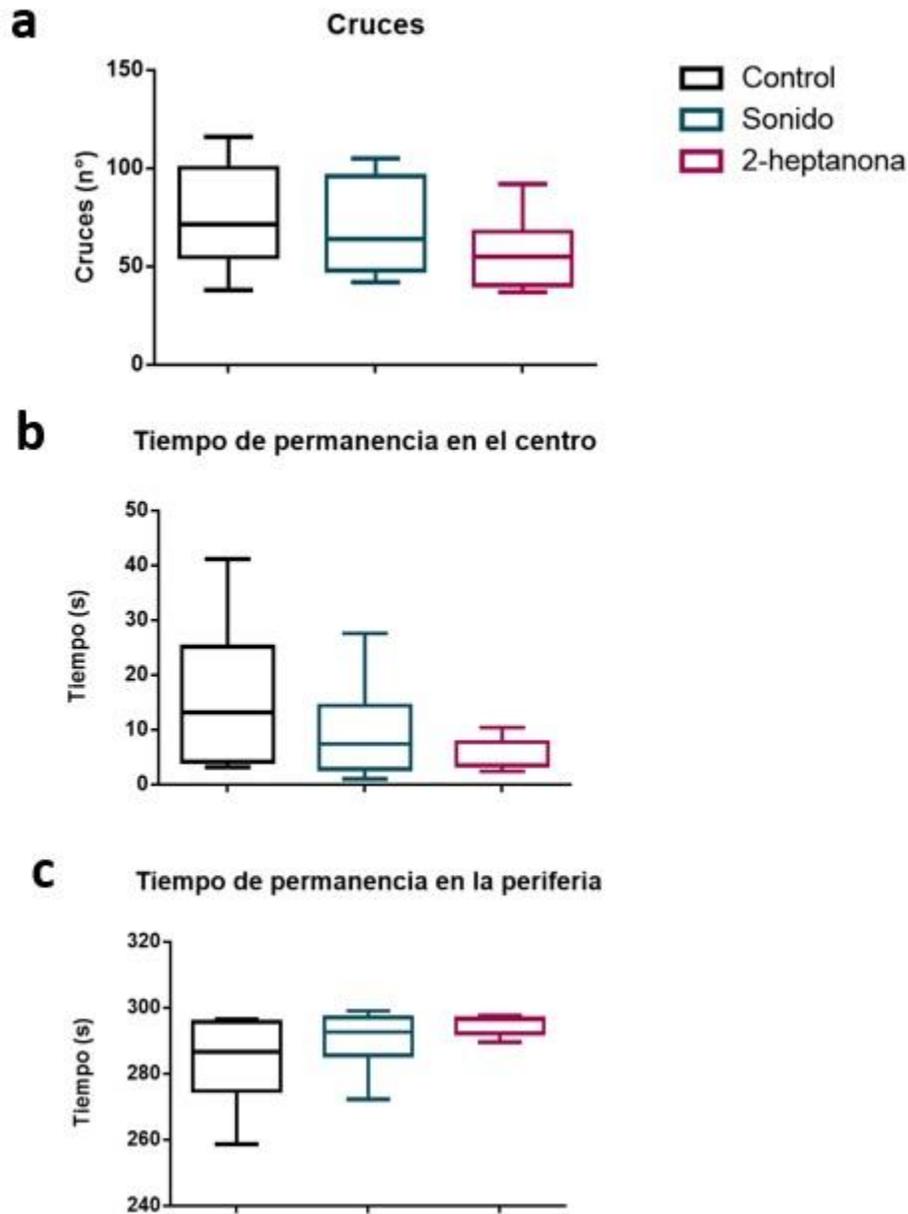


Fig.4. Prueba de campo abierto. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en número de cruces (a), tiempo de permanencia en centro y en la periferia (b, c).

3.3. Campo abierto

No se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos en las variables de la prueba de campo abierto: número total de cruces [H= 2.088, 2 gl, $p= 0.352$], tiempo en el centro [H= 2.822, 2 gl, $p= 0.243$] y tiempo en periferia [H= 3.354, 2 gl, $p= 0.187$]. Fig. 4.

4. Discusión

El objetivo de este estudio fue identificar las diferencias a nivel conductual en ratas macho 24h después de la exposición a 2-heptanona, los resultados fueron comparados contra los de un grupo sometido a estrés auditivo y un grupo sin ningún tipo de estimulación (control). Utilizamos estrés auditivo para equiparar los efectos entre estímulos aversivos de diferente modalidad. La 2-

heptanona generó en las ratas expuestas mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados y mayor tiempo en congelamiento sin afectar la locomoción. No se encontró ninguna diferencia significativa atribuible a la exposición al sonido.

En este estudio, se utilizaron pruebas que miden conductas equivalentes a algunas de las manifestaciones clínicas de la ansiedad, como el laberinto de brazos elevados, diseñado en 1984 por Handley y Mithani,²⁰ y la prueba de enterramiento defensivo, diseñada por Pinel y Treit en 1978.²¹ En ambas pruebas las variables a medir implican desplazamiento propositivo del cuerpo del roedor, es decir movimientos. Por ello, cuando se aplican estas pruebas es indispensable descartar un cambio de la motricidad, por lo que siempre se acompañan de la prueba de campo abierto, creada por Hall (1934).²² Por ejemplo, alguna sustancia puede producir un aumento de la motricidad (una Anfetamina) lo que hará que la rata entre y salga de los brazos del laberinto elevado y además aumente el tiempo de enterramiento, esto da un dato contradictorio ya que el cambio en el laberinto de brazos elevados quizá se interprete como una acción ansiolítica, mientras que la acción en la prueba de enterramiento, haga lo contrario. La prueba de campo abierto, indicará un aumento de la motricidad. Ese es el resultado y ninguna acción sobre indicadores de ansiedad.

El laberinto de brazos elevados es una prueba validada donde a los animales se les permite la libre exploración de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, este modelo usa el conflicto entre la tendencia natural de la rata a la exploración y su temor a los espacios elevados y abiertos.²³ Es comúnmente usado para poner a prueba las propiedades ansiogénicas y ansiolíticas de agentes farmacológicos. Mientras que roedores tratados con compuestos ansiolíticos como benzodiazepinas (diazepam) y algunos neuroesteroides (como la progesterona y alopregnalona)²⁴ permanecen más tiempo en los brazos abiertos, los roedores tratados con agentes ansiogénicos muestran una reducción del tiempo de permanencia en los brazos abiertos, a expensas de un mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados.²⁵⁻⁻²⁶ Es por esto que un aumento en el tiempo de permanencia en los brazos cerrados, se considera como un indicador

de ansiedad alta. Los sujetos del grupo 2-heptanona pasaron mayor cantidad de tiempo en los brazos cerrados, lo que indica que la exposición a la cetona produjo ansiedad y verifica la propiedad ansiogénica de esta feromona.

En cambio, no se encontraron efectos en el tiempo acumulativo en la prueba de enterramiento defensivo, pero sí en el de congelamiento. En este sentido, puede no existir relación entre los niveles de enterramiento y las conductas relacionadas a la ansiedad evaluada en el laberinto de brazos elevados,²⁷ dado que estas pruebas miden diferentes tipos de ansiedad. El laberinto de brazos elevados se fundamenta en la aversión natural del roedor a los espacios abiertos y altos,^{28, 29} por lo tanto, es un indicador de una forma peculiar de ansiedad, la agorafobia. Por otro lado, la prueba de enterramiento defensivo posee un alto grado de validez para el estudio de la ansiedad generalizada y la aprensión ansiosa.³⁰ Entonces, las ratas expuestas a la 2-heptanona no desarrollaron ansiedad generalizada, pero si aumentó su fobia a espacios abiertos, lo que puede relacionarse con la reacción de congelamiento evaluada precisamente en la prueba de enterramiento defensivo.

Aunque el tiempo de enterramiento se ha utilizado como un indicador de miedo/ansiedad experimental, desde las observaciones de Hudson³¹ y Pinel y Treit,²¹ se ha demostrado una considerable variación en las respuestas a esta prueba, algunos animales pueden no expresar la conducta de enterramiento y permanecer lejos del estímulo aversivo (la barra electrificada) y en cambio permanecer inmóviles, es decir, en congelamiento. El que esta conducta exprese características parecidas a la ansiedad es evidenciado porque en paralelo al desarrollo de congelamiento ocurre un aumento en el nivel plasmático de las llamadas hormonas de estrés, como la corticosterona y la adrenalina.³²

El congelamiento en condiciones naturales es una respuesta defensiva coordinada que consiste en permanecer con el cuerpo inmóvil con excepción de movimientos ventilatorios y una postura tensa que resulta de un incremento en el tono muscular en este estado defensivo,³³ permitiendo a la rata ser menos detectable a sus depredadores típicos, que son más propensos a

atacar a presas en movimiento.³⁴ El congelamiento se encuentra regulado por estructuras como la amígdala, que envía proyecciones desde el núcleo central hasta la sustancia gris periacueductal y el hipotálamo lateral.³⁵ La sustancia gris periacueductal es una región relacionada con el dolor y la analgesia, pero su porción ventrolateral es crítica para la respuesta del congelamiento, mientras que la porción dorsolateral está más asociada a respuestas de ataque-huída,³⁶ el hipotálamo lateral modula la respuesta vegetativa.³³

Los roedores suelen pasar más tiempo en congelamiento a medida que perciben aumento en el peligro. La expresión de respuestas defensivas específicas, corresponden a determinados tipos de exposición a amenazas,³⁷ donde al percibir una amenaza potencial o incierta las ratas dirigen una exploración cautelosa. En caso de percibir un depredador a la distancia (más de 1 m), predomina la respuesta de congelamiento. Finalmente, cuando el depredador está en contacto con la rata o demasiado cerca, la rata despliega inmovilidad tónica (finge estar muerta) o realiza algún ataque defensivo.³⁸ Así, los factores determinantes para la expresión del congelamiento parecen ser la distancia y la presencia de una ruta de escape (en caso de existir una, la mayoría de las veces el sujeto preferirá escapar).³⁹ Por lo que el congelamiento está mediado por un sistema relacionado con el miedo activado por un estímulo distal relacionado con algún peligro para el animal. Esto podría reforzar la noción de la 2-heptanona como sustancia de alarma. Este estado facilitaría la expresión de una respuesta defensiva selectiva, donde tras la exposición a un estímulo de alarma (como la 2-heptanona), activaría una respuesta de congelamiento relacionada con el miedo innato.⁴⁰ Esta afirmación se ve reforzada por el hecho de que no se detectaron cambios en la actividad locomotriz, ya que una disminución en la motilidad bien podría relacionarse con la inmovilidad, una de las características del congelamiento. Pero, este no fue el caso. Aumentó el congelamiento sin que hubiera cambios de la motricidad de las ratas expuestas a la 2-heptanona. La prueba de campo abierto, es empleada para evaluar tanto la conducta exploratoria ante un entorno novedoso

y sin protección, como para medir el efecto de agentes farmacológicos sobre la actividad locomotriz espontánea,⁴¹ en este estudio se utilizó esta prueba después del laberinto de brazos elevados y enterramiento defensivo, con la finalidad de identificar cambios en la actividad motriz asociada a los efectos de la exposición a los estímulos sensoriales que pudieran influenciar en el desempeño de los animales.

Las ratas expuestas a estrés auditivos no mostraron diferencias significativas 24h después de la exposición, en las pruebas de laberinto de brazos elevados, enterramiento defensivo y campo abierto al compararlas contra el grupo control. Los estímulos auditivos temporalmente impredecibles han demostrado generar efectos parecidos a la ansiedad cuando son aplicados en una fase aguda (durante la prueba).¹⁵ Sin embargo, estos efectos no fueron observables durante las pruebas empleadas, lo que podría indicar que estas respuestas desaparecen en un lapso breve, ya que no se encontraron o son menores 24h después de la exposición al estímulo, como si fue observable después de la exposición a la 2-heptanona. Se están comparando dos formas de estimulación en el largo plazo. La acción estresante inmediata de los estímulos auditivos impredecibles ya ha sido ampliamente documentada,¹⁵ mientras que la 2-heptanona evoca respuestas en el largo plazo, al menos 24h después, lo que sugiere mayor relevancia para la supervivencia de la especie. Sin embargo, es necesario un nuevo diseño experimental para corroborar esta especulación.

El efecto de la 2-heptanona se mantiene después de 24h. Lo que parece estar relacionado con la forma en que este cuerpo cetónico es captado y su relevancia como sustancia de alarma en esta especie.^{17, 18} Los estímulos odoríferos han sido empleados exitosamente para inducir congelamiento a nivel experimental, compuestos como la 2,3,5-trimetil-3-tiazolina, un componente de la orina y heces de zorros y su análogo 2-metil-2-tiazolina, son capaces de evocar respuestas relacionadas con el miedo innato en roedores de laboratorio,⁴² quienes tienen miedo a serpientes, zorros y gatos, a pesar de haber sido aisladas durante generaciones.⁴³ El miedo innato representa un mecanismo conservado evolutivamente, codificado genéticamente.^{42, 43} En

este sentido, aunque ambos sistemas sensoriales son importantes para la comunicación, desarrollo y supervivencia de los mamíferos, el sistema olfativo en términos evolutivos es uno de los más antiguos y mejor preservados.⁴⁴

Algunos estudios han mostrado que las memorias evocadas por estímulos olfativos son emocionalmente más intensas que las evocadas por estímulos auditivos o visuales.⁴ Además, previamente se ha demostrado que la estimulación olfativa con 2-heptanona aumenta la responsividad entre la amígdala medial y el hipocampo 48h después de la exposición.¹⁴ Esta activación modula el proceso de almacenamiento de la memoria en el hipocampo, por lo que estas características del sistema olfativo y de la 2-heptanona, podrían ser los responsables de las diferencias encontradas entre los tratamientos, relacionados con un trazo de memoria olfativa que perdura más allá de 24h. Dentro de los estudios prospectivos, esta investigación motiva a profundizar sobre los circuitos neurobiológicos implicados en la respuesta a esta sustancia de alarma, a corto mediano y largo plazo sobre estructuras relacionadas con las respuestas defensivas y toma de decisiones, como la amígdala basolateral y la corteza prefrontal media.

5. Conclusión

El principal hallazgo consiste en la demostración de que una feromona de alarma es capaz de producir conductas defensivas al menos un día después de su presentación. Es notable que, en esta especie de roedores, los olores de sus predadores son inútiles para combatir una plaga.⁴⁵ Esto indica que en estos roedores se libera alguna sustancia que promueve la alarma en el resto de la colonia. Es altamente posible que se trate de la 2-heptanona.¹⁷ En el presente estudio se incluyeron animales de bioterio que han nacido en cautiverio; sin embargo, son sensibles a esta feromona, como se ha demostrado en estudios tanto conductuales como electrofisiológicos, ya referidos. Por lo tanto, la respuesta es posiblemente una conducta determinada genéticamente y que mediante procesos de selección natural permite la supervivencia de la especie mediante estímulos para los que esta

especie es particularmente sensible, se trata de estímulos olfatorios.

6. Agradecimientos

M.S.A recibió beca de CONACYT (Reg. 746756) para estudios de doctorado.

7. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tiene conflictos de interés.

8. Referencias

1. Gutiérrez-García AG, Contreras CM. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Rev Biomed* 2002 13: 189-209.
2. Davis RL. Olfactory Learning. *Neuron* 2004 44(1): 31-48.
3. Takahashi L. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Front Behav Neurosci.* 2014 8: 72.
4. Mouly AM, Sullivan R. Memory and Plasticity in the Olfactory System: from infancy to adulthood. *Front Neurosci, The Neurobiology of Olfaction.* CRC Press/Taylor & Francis. 2009 pp367–39.
5. Perry RE, Al Ain S, Raineki C, Sullivan RM, Wilson DA. Development of odor hedonics: Experience-dependent ontogeny of circuits supporting maternal and predator odor responses in rats. *J Neurosci* 2016 36(25) :6634-50.
6. Willander J, Larsson M. Olfaction and emotion: The case of autobiographical memory. *Mem Cognit* 2007 35(7): 1659-63.
7. Palmer A, Ress A, Malmierca MS, Hackett TA. Structural organization of the ascending auditory pathway. *The Oxford Handbook of Auditory Science:*

- The Auditory Brain. Oxford University Press, 2010.
8. Asaba A, Hattori T, Mogi K, Kikusui T. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front Neurosci* 2014 8: 231.
 9. Bergman P, Västfjäll D, Tajadura-Jiménez A, Asutay E. Auditory-induced emotion mediates perceptual categorization of everyday sounds. *Front Psychol* 2016 7: 1565.
 10. Wang JQ, Nicol T, Skoe E, Sams M, Kraus N. Emotion and the auditory brainstem response to speech. *Neurosci Lett* 2010 469(3): 319-323.
 11. Charitidi K., Canlon B. Estrogen receptors in the central auditory system of male and female mice. *Neuroscience* 2010 165(3): 923-33.
 12. Oatley K, Jenkins J. *Understanding emotions*. Blackwell Publ, USA. 1996 pp 23-26.
 13. LeDoux J. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000 23: 155–184.
 14. Contreras-García CM. Exposure to an alarm pheromone combined with footshock stress enhances responsivity of the medial amygdala-hippocampus circuit. *Am J Psychiatry and Neurosci* 2014 2(6): 83-88.
 15. Herry C, Bach DR, Esposito F, Di Salle F, Perrig WJ, Scheffler K, Luthi A, Seifritz E. Processing of temporal unpredictability in human and animal amygdala. *J Neurosci* 2007 27(22): 5958–66.
 16. Gutiérrez-García AG, Contreras CM. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Rev Biomed* 2002 13: 189-209.
 17. Gutiérrez-García AG, Contreras CM, Mendoza M., Cruz S, García O, Rodríguez J, Bernal B. A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behav Brain Res* 2006 167(1): 30-5.
 18. Contreras CM, Gutiérrez-García AG, Molina T, Mendoza R. 2-Heptanone increases the firing rate of the basal amygdala: role of anterior olfactory epithelial organs. *Neuropsychobiology* 2012 66(3): 167-73.
 19. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México, D.F.: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
 20. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1984 327(1): 1-5.
 21. Pinel JP, Treit D. Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1978 92(4): 708-712.
 22. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Am Psychol Assoc* 1934 18 (3): 385–403.
 23. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007 2(2):322–328.
 24. Martínez L, Estrada E, López C, Contreras CM., Fernández-Guasti A. Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 2000 25(2): 109-20.

25. Hogg S. A Review of the Validity and Variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996 54(1): 21-30.
26. Pawlak CR, Karrenbauer BD, Schneider P, Ho YJ. The elevated plus-maze test: differential psychopharmacology of anxiety-related behavior. *Emotion Review* 2012 4(1): 98–115.
27. Sandbak T, Murison R. Behavioural responses to elevated plus-maze and defensive burying testing: effects on subsequent ethanol intake and effect of ethanol on retention of the burying response. *Alcohol and Alcoholism* 2001 36(1): 48-58.
28. Korte SM, De Boer SF, Bohus B. Fear-potentiation in the elevated plus-maze test depends on stressor controllability and fear conditioning. *Stress* 1999 3(1): 27–40.
29. Korte SM, De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 2003 463(1-3): 163-75.
30. De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* 2003 463(1-3): 145-61.
31. Hudson BB. One-trial learning in the domestic rat. *Genet Psychol Monogr* 1950 41: 99-145.
32. Fucich EA, Morilak DA. Shock-probe defensive burying test to measure active versus passive coping style in response to an aversive stimulus in rats. *Bio Protoc* 2018 8(17).
33. Roelofs K. Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017 372(1718).
34. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav* 2001 25(3): 205-18.
35. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 1988 8(7): 2517-29.
36. Walker P, Carrive P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 2003 116(3): 897–912.
37. Blanchard DC, Griebel G, Pobbe R, Blanchard RJ. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci Biobehav Rev* 2011 35(4): 991-8.
38. Marx BP, Forsyth JP, Gallup GG, Fusé T, Lexington JM. Tonic immobility as an evolved predator defense: Implications for sexual assault survivors. *Clinical Psychology Science and Practice* 2008 15(1): 74–90.
39. Blanchard DC, Griebel G, Pobbe R, Blanchard RJ. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci Biobehav Rev* 2011 35(4): 991-8.
40. Lapis MD, Bondi CO, Doyen J, Rodriguez GA, Bédard T, Morilak DA. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol* 2008 20(10): 1115-37.
41. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015 (96):524-34.

42. Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang T, Russel J, Klewe-Nebenius D, Wang Li, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Yuwenbin T, Xiaowei W, Miyoshi C, Irukayama Y, Wang K, Sakurai T, Funato H, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa B, Qinghua L. Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nat Commun* 2018 9(1).
43. Fendt M, Endres T. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – Just repugnant or really fear-inducing? *Neurosci Biobehav Rev* 2008 32(7): 1259-66.
44. Brai E, Alberi L. Olfaction, among the first senses to develop and decline. *En Sensory Nervous System. IntechOpen* 2018: 65-99.
45. Stryjek R, Mioduszezewska B, Spaltabaka-Gędek E, Juszcak GR. Wild Norway rats do not avoid predator scents when collecting food in a familiar habitat: a field study. *Sci Rep* 2018 8(1): 9475.