



Jornades de Foment de la Investigació

**VOCALIZACIONES
ULTRASÓNICAS:
NUEVO PARADIGMA
PARA EL REGISTRO
DE RESPUESTAS
EMOCIONALES
NO APRENDIDAS
EN ANIMALES**

Autors

Marta PARDO
Miguel A. ESCRIG
Gema CABALLER
Carlos M. GONZÁLEZ
Mercè CORREA.

RESUMEN

El registro de la respuesta emocional en animales posee obvias limitaciones. Los paradigmas utilizados hasta la fecha se basan en el registro de respuestas indirectas en las cuales el componente motor tiene una gran implicación. Así por ejemplo en roedores, en las respuestas de miedo o aversión innata a las alturas o a espacios iluminados y abiertos se emplean laberintos elevados con zonas protegidas o abiertas y se registra el desplazamiento del animal a esos compartimentos controlando que los efectos motores sean mínimos o corrigiendo el efecto. Por esta razón el registro de una respuesta innata no limitada a la conducta motora general del animal resulta de gran relevancia en el estudio de la emoción. En ratas, se ha observado que en condiciones consideradas aversivas se genera un elevado nivel de vocalizaciones de baja frecuencia (20kHz), mientras que en las consideradas apetitivas aumentan las vocalizaciones de alta frecuencia (75kHz). En nuestro estudio, aplicamos estos parámetros a los efectos de una droga ansiolítica como el alcohol y a las vías de administración de la misma. Demostramos que una inyección periférica genera más vocalizaciones aversivas que la administración intracerebral. Así mismo comprobamos que los animales vocalizan menos en el rango de baja frecuencia cuando se les administra alcohol en relación a cuando se les administra el vehículo lo cual apunta a un efecto de reducción de efectos aversivos de esta dosis de alcohol.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas se conoce que ciertas especies animales, entre ellas los roedores, emiten vocalizaciones ultrasónicas (VU) (para una revisión reciente ver; Portfors, 2007). Además, se han podido observar diferentes rangos de frecuencia en los que los animales suele emitir, dependiendo de las condiciones que lo rodean y, por ende, del estado que este contexto o droga le causen. Algunos autores afirman que estas vocalizaciones reflejan la motivación y el estado afectivo específico del animal en cada momento (Knutson, 2002). Dentro de las frecuencias emitidas se han podido diferenciar dos rangos que englobarían por un lado; situaciones o estados apetitivos (rango de frecuencia alta, 50-75 kHz) y por otro situaciones aversivas (rango de frecuencia baja, 20-22 kHz). Las vocalizaciones en el rango considerado positivo son emitidas ante situaciones como: juego social entre congéneres, drogas de abuso, estimulación eléctrica cerebral, conducta sexual, etc. (Burgdorf et al., 2000; 2001a; Burgdorf y Panksepp 2001c; Knutson et al., 1998). Por otro lado, estímulos aversivos como un shock, una luz intensa, ser el macho perdedor en un encuentro agonístico o el efecto aversivo de una droga provocan no sólo un aumento en la emisión de vocalizaciones en el rango de 20-22 kHz sino que además causan un decremento de las vocalizaciones apetitivas (Burgdorf et al., 2001b; Knutson et al., 1999).

Hasta el momento, son pocos los estudios que han utilizado este nuevo paradigma de VU en roedores para la evaluación de respuestas de ansiedad (Schwartz et al., 2007). Las respuestas de ansiedad en ratas han sido tradicionalmente medidas con paradigmas como el laberinto elevado en cruz y, en menor medida, la caja de luz-oscuridad. Ambos se valen de las respuestas de miedo o aversión innata a las alturas o a espacios iluminados y abiertos que presentan los roedores. El estado del animal, tanto en ratas como en ratones, va

Vocalizaciones ultrasónicas: Nuevo paradigma para el registro de respuestas emocionales no aprendidas en animales.

a poder ser observado mediante las elecciones que este realice, como por ejemplo; estar más tiempo en el compartimento abierto que en el cerrado. Ambos paradigmas han mostrado ser muy eficaces para evaluar los efectos ansiolíticos de diferentes drogas. Por ejemplo, mediante ambos paradigmas se han podido obtener datos consistentes del efecto ansiolítico de dosis moderadas de alcohol (Stewart et al., 1993). Sin embargo, estos paradigmas se basan en el registro de respuestas indirectas en las cuales el componente motor tiene una gran implicación. Ello hace que cualquier manipulación experimental que afecte la respuesta motora sesgará el registro del efecto emocional. Por esta razón el registro de una respuesta innata no limitada a la conducta motora general del animal resulta de gran relevancia en el estudio de la emoción.

El presente estudio pretende comparar y explorar el impacto de una dosis ansiolítica de etanol sobre la conducta de ratas expuestas a diferentes paradigmas de ansiedad con aquellas expuestas al paradigma de registro de VU. Se trata de mostrar una alternativa al uso de los paradigmas tradicionales que requieren de la actividad locomotora del animal.

MÉTODO

Sujetos:

Ratas macho adultas de la estirpe Sprague Dawley (Janvier S.L, Paris, Francia). A su llegada al laboratorio los animales tenían 4 semanas de edad y pesaban 250-300 gramos. Fueron alojadas individualmente en cajas de plexiglás (20X40X20 cm) y mantenidas en el estabulario para su aclimatación al menos una semana antes del comienzo de los experimentos. En el estabulario las condiciones eran: Humedad media de 55% y temperatura constante de $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclos 12-h/12-h luz-oscuridad y comida y agua de libre acceso. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz. Todos los procedimientos siguieron las directrices para el uso de animales de experimentación del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/ECC).

Cirugía:

Para la implantación de las cánulas que permitían la administración intraventricular (ICV) los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral al 4% (IP) antes de ser colocados en el aparato estereotáxico (Kopf Instruments USA). Se implantó en el ventrículo una cánula unilateral (10 mm de longitud y un diámetro de 23 g). Las coordenadas estereotáxicas desde bregma fueron: +0.5 mm AP, +/- 1.3 mm ML, -3.2 mm DV). A los animales se les dejó entre 7 y 10 días de recuperación antes del test.

Drogas:

El etanol (Panreac, España) fue preparado en disolución al 20% v/v con solución salina (cloruro sódico al 0.9% w/v) la cual fue utilizada como control.

Aparataje:

En el presente estudio se utilizaron 3 sistemas para el registro de ansiedad:

El laberinto en cruz elevado (LCE) hecho de metacrilato, consistente en dos brazos abiertos con un pequeño

Vocalizaciones ultrasónicas: Nuevo paradigma para el registro de respuestas emocionales no aprendidas en animales.

borde para evitar que los animales caigan (45X15x2 cm), y dos brazos cerrados transparentes (45X15X30 cm). La plataforma central medía 15X15 cm. El laberinto estaba elevado a 46 cm del suelo. El suelo de los brazos y de la plataforma era de color negro, con resina de epoxy para evitar que filtrara la orina de los animales.

La caja luz-oscuridad (L-D) es una caja con dos compartimentos separados pero que se comunican con una puerta de 10X14 cm. El compartimiento abierto es de color blanco, está iluminado con una intensidad de 25-W y sus dimensiones son mayores que el cerrado (39X40X40 cm). El compartimiento cerrado (25X40X40 cm) está pintado de negro y tiene una tapa que lo cubre.

El paradigma de registro de vocalizaciones ultrasónicas (Ultravox. Noldus, Holanda) consiste en cuatro micrófonos detectores conectados a un sistema de regulación de umbrales. El sistema de detección está conectado a un sistema de análisis y cuantificación de frecuencias. Los micrófonos se situaron a 25 cm del suelo sobre rejillas que cubrían una caja oscura (59X29X33 cm) en la que se colocó al animal. Dos detectores en extremos opuestos registraban las frecuencias bajas (20-22 kHz) y otros dos, también en extremos opuestos, las frecuencias altas (50-75 kHz).

Procedimiento:

Las ratas fueron habituadas al manejo del experimentador y a las condiciones experimentales de la sala de test, durante dos sesiones de 20 minutos en los 2 días previos a la sesión experimental. El día del test, dependiendo de la vía de administración (ICV o IP), se empleó un procedimiento diferente por el tiempo necesario para que la droga ejerza su efecto, tiempo mayor en la vía IP, donde se procedió a situar a la rata en la caja transparente durante 10 minutos tras la inyección, previa introducción en el paradigma.

Experimento 1: Validación del paradigma de VU.

El objetivo del primer experimento era validar el nuevo paradigma de vocalizaciones ultrasónicas como método objetivo del estado afectivo del animal. Se comprobó que el sistema era sensible a las diferencias en la respuesta del animal frente a diferentes estímulos. Para ello se aplicó un estímulo clasificado como aversivo; el pinzamiento agudo de la cola previa colocación del animal en la caja empleada para las vocalizaciones, donde se registraron las vocalizaciones durante 10 minutos.

En segundo lugar se realizó un experimento para comparar la administración de una solución salina inocua por la vía intraperitoneal (IP) con la administración por la vía intracerebral (ICV). Tras la inyección correspondiente, se colocó al animal en una caja de estabulación, durante 15 minutos para permitir la difusión de la droga. Tras ello, se introdujo al animal en la caja de las vocalizaciones, donde estas se registraron durante 10 minutos.

Experimento 2: Comparación del paradigma de VU con los paradigmas tradicionales para el registro de ansiedad en roedores.

Este segundo experimento tenía como objetivo principal mostrar el efecto ansiolítico del alcohol administrado de manera periférica, comparando los paradigmas tradicionales, el laberinto en cruz elevado (A) y la caja luz-oscuridad (B), con el nuevo paradigma de vocalizaciones ultrasónicas (C). En todos los paradigmas

Vocalizaciones ultrasónicas: Nuevo paradigma para el registro de respuestas emocionales no aprendidas en animales.

a diferentes grupos de animales se les administró 0,0 ó 0,5 g/kg de etanol, IP.

A- Tras la inyección de la droga el animal fue colocado en una caja de estabulación y a los 10 minutos se le introdujo en la plataforma central del laberinto elevado en cruz, con la cabeza dirigida hacia el brazo abierto. Se registró su conducta durante 5 minutos. El parámetro registrado fue el tiempo empleado en los brazos abiertos, considerándose como tiempo en brazo abierto el momento en que el animal cruzaba con las 4 patas en una de estas áreas.

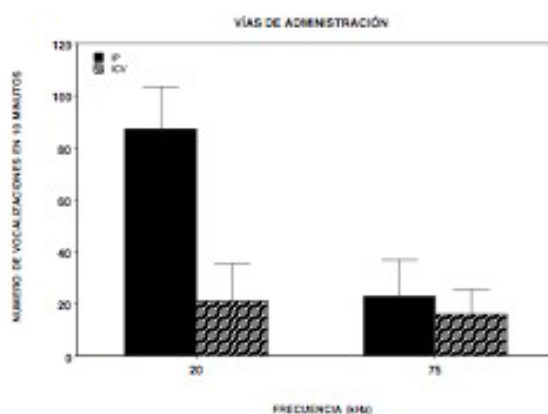
B- Inmediatamente tras la inyección de la droga la rata se colocó en el compartimento cerrado de la caja luz-oscuridad, durante 10 minutos. Pasado este tiempo se permitió el acceso al otro compartimento, durante 10 minutos durante los cuales se registró el número de veces que el animal entraba en el compartimento iluminado con las 4 patas.

C- A los 15 minutos de la inyección la rata se colocó en la caja en la que estaban instalados los micrófonos durante 10 minutos en los que se registraron únicamente sus vocalizaciones.

Resultados

Experimento 1: Validación del paradigma de VU.

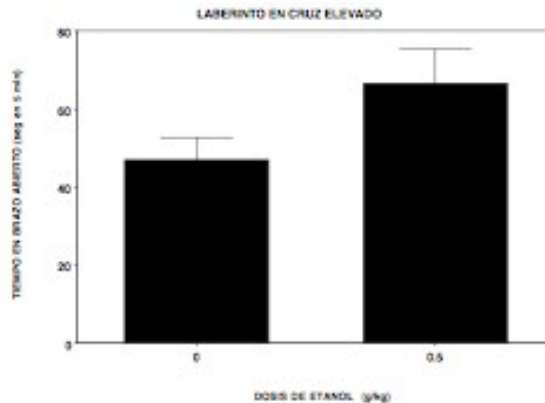
Al igual que había ocurrido en el estudio piloto con el pinzamiento de la cola, los datos de la comparación entre las diferentes vías de administración de drogas indicaron que la administración periférica inducía un mayor número de vocalizaciones en el rango de baja frecuencia. El resultado de una prueba T de 2 colas para muestras independientes indica que las diferencias fueron significativas ($t = -3.066$, $df=6$, $p < 0.05$), sin embargo, no existieron diferencias en las vocalizaciones de alta frecuencia ($t = -0.856$, $df = 6$, $p = 0.42$).



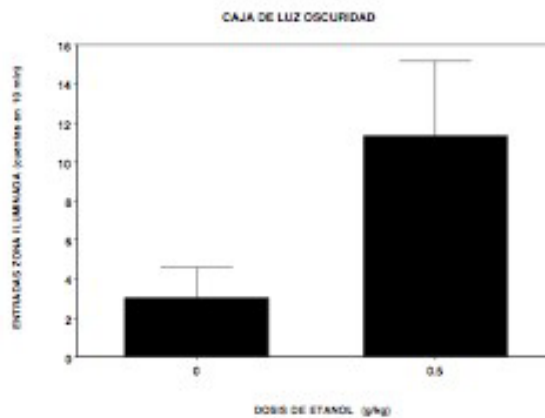
Experimento 2: Comparación del paradigma de VU con los paradigmas tradicionales para el registro de ansiedad en roedores.

A. En el caso de los grupos en los cuales se observó el impacto de una dosis de etanol sobre la respuesta de ansiedad en un laberinto elevado, el resultado de una prueba T de 2 colas para muestras independientes indica que hubo un efecto significativo del etanol en relación al grupo que recibió salina ($t = -2.390$, $df=16$, $p < 0.05$). El grupo etanol pasó más tiempo a los brazos abiertos.

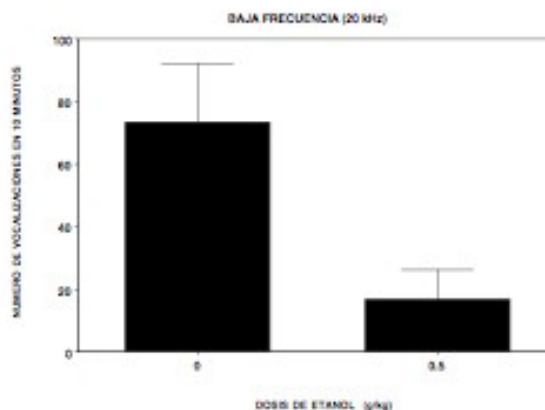
Vocalizaciones ultrasónicas: Nuevo paradigma para el registro de respuestas emocionales no aprendidas en animales.



B. En los grupos donde la ansiedad fue evaluada en una caja de luz-oscuridad, el resultado de una prueba T de 2 colas para muestras independientes también indicó que hubo un efecto significativo del etanol en relación al grupo control ($t = -2.985$, $df=7$, $p < 0.05$). El grupo etanol salió más veces al compartimento iluminado.



C. En la evaluación de las vocalizaciones de baja frecuencia el resultado de una prueba T de 2 colas para muestras independientes indicó que hubo un efecto significativo del etanol en relación al grupo control ($t = 2.495$, $df=7$, $p < 0.05$). El grupo etanol vocalizó menos en el rango de baja frecuencia, el considerado aversivo.



DISCUSIÓN

Los datos preliminares confirmaron la validez del método VU para registrar las variaciones en el estado afectivo del animal. Tras el pinzamiento de la cola, estímulo claramente aversivo, los animales emitieron un mayor número de vocalizaciones en el rango de 20 kHz. Así mismo, se observó que la administración de una solución salina mediante una inyección en la cavidad intraperitoneal, en general aumenta el número de vocalizaciones en relación a las vocalizaciones emitidas por los animales que recibieron una inyección intracraneal. Es decir algunas vías de administración inducen una mayor respuesta emocional en los animales que otras. En nuestro caso, probablemente debido al procedimiento de inmovilización, junto a la activación de los receptores periféricos del dolor, la inyección IP produjo un mayor número de vocalizaciones, pero específicamente aumentaron significativamente las vocalizaciones aversivas (20kHz). La administración intracraneal de una solución salina en ratas tras un periodo de recuperación de la cirugía, no resultó tener un gran impacto en las VU emitidas. Esto implicaría que esta vía de administración evita el impacto del dolor agudo y el estrés de la manipulación experimentado por la inyección IP.

En cuanto a los datos obtenidos al comparar los diferentes paradigmas de ansiedad con el registro de VU observamos que los 3 métodos obtienen resultados equivalentes. Tanto en el laberinto en cruz elevado como en la caja luz-oscuridad la dosis de 0,5 g/kg de etanol produce un efecto ansiolítico; los animales dedican más tiempo a permanecer en los brazos abiertos y realizan un mayor número de entradas en el compartimento iluminado que los animales control. Estos efectos ansiolíticos del etanol en los paradigmas tradicionales se traducen en el caso del registro de las VU, en una reducción significativa en el número de vocalizaciones emitidas en el rango aversivo (20 kHz). Así pues, el paradigma de vocalizaciones ultrasónicas parece ser un buen indicador del estado emocional del roedor, eliminando alguno de los inconvenientes de los paradigmas tradicionales de registro de ansiedad como son los efectos motores.

BIBLIOGRAFÍA

- BURGDORF, J.; KNUTSON, B. AND PANKSEPP, J. (2000). Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behav Neurosci* 114, 320–327.
- BURGDORF, J.; KNUTSON, B.; PANKSEPP, J. AND IKEMOTO, S. (2001a). Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Neurosci* 115, 940–944.
- BURGDORF, J.; KNUTSON, B.; PANKSEPP, J. AND SHIPPENBERG, T. (2001b). Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs. *Psychopharmacology* 155, 35–42.
- BURGDORF, J. AND PANKSEPP, J. (2001c). Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* 72, 167–173.
- KNUTSON, B.; BURGDORF, J. AND PANKSEPP, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 112, 65–73.
- KNUTSON, B.; BURGDORF, J. AND PANKSEPP, J. (1999). High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats. *Physiol Behav* 66, 639–643.
- KNUTSON, B.; BURGDORF, J. AND PANKSEPP, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull* 128, 961–977.
- PORTFORS CV. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 46(1):28-34.
- SCHWARTING RK, JEGAN N, WOHR M. (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav Brain Res.*
- STEWART, R.B.; GATTO, G.J.; LUMENG, L.; LI, T.K. Y MURPHY, J.M. (1993). Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* 10, 1–10.