



Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

**“¿Despliegan los conejos domésticos conductas antidepredadoras ante
olores de depredadores potenciales?”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a
MVZ. Alfredo Rodríguez Vázquez

Director de Tesis

Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda

Jurado

Dr. Amando Bautista Ortega
Dr. Kurt Hoffman
Dra. Robyn Hudson
Dra. Carolina Valdespino Quevedo

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 12, 2014



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta




COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E


Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Alfredo Rodríguez Vázquez realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **¿Despliegan los conejos domésticos conductas antidepredadoras ante olores de depredadores potenciales?**.


Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 21 DE 2013


DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA


DR. KURT LEROY HOFFMAN TIBER


DRA. ROBYN E. HUDSON


DRA. CAROLINA VALDESPINO QUEVEDO


DRA. VERÓNICA REYES MEZA


DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda y la asesoría de la Dra Robyn E Hudson, Amando Bautista y Kurt Hoffman.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UTAx) Unidad Periférica Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante una beca con número 268850 a ARV.



Agradecimientos

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) por abrirme sus puertas, por confiar en mí y haberme permitido formar parte de su grupo.

A los miembros del comité revisor, Amando Bautista, Robyn Hudson y Kurt Hoffman por su asesoría durante la realización de este estudio.

A los integrantes del Jurado de Examen Cerrado, Dras. Carolina Valdespino y Verónica Reyes por la revisión de la tesis y sus valiosas observaciones y disposición para aclarar mis dudas así como para ayudarme a lograr estas metas.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	7
I INTRODUCCIÓN	9
1. Relación presa-depredador.....	11
1.1. Pistas químicas emitidas por los depredadores.....	12
1.2. Respuesta de las presas a pistas químicas de depredadores.....	14
1.3. Detección de pistas químicas de depredadores por parte de las presas.....	16
2. Modelo de estudio: el conejo doméstico.....	24
2.1. Una especie principalmente olfativa.....	24
2.2. El conejo europeo responde a los olores de los depredadores.....	24
II ANTECEDENTES	25
1. Compuestos que estimulan al sistema trigeminal.....	25
2. Los olores emitidos por los depredadores, ¿estimulan las terminaciones trigeminales nasales?.....	26
III HIPÓTESIS	27
IV OBJETIVO GENERAL	27
V METODOLOGÍA GENERAL	27
1. Animales.....	27
2. Estímulos.....	28
VI. EXPERIMENTO 1.....	28
3.1. Predicciones.....	30
3.2. Protocolo experimental.....	31
3.3. Análisis de datos.....	33
3.4. Resultados.....	33
3.5. Discusión.....	35
VII. EXPERIMENTO 2.....	36
4.1. Predicciones.....	37
4.2. Protocolo experimental.....	38
4.3. Análisis de datos.....	39
4.4. Resultados.....	40
4.5. Discusión.....	43
VIII. EXPERIMENTO 3.....	43
5.1. Predicciones.....	44
5.2. Protocolo experimental.....	45
5.3. Análisis de datos.....	46
5.4. Resultados.....	47
5.5. Discusión.....	52
IX DISCUSIÓN GENERAL.....	52
X CONCLUSIÓN FINAL.....	54
XI REFERENCIAS.....	55

RESUMEN

El reconocimiento y evitación efectivos de un depredador es esencial para la supervivencia de cualquier especie presa. Así, las especies presa han desarrollado mecanismos para la detección temprana de depredadores, como la detección de sus olores, ello les confiere la ventaja de evitar encuentros directos con los depredadores, aumentando las posibilidades de supervivencia y adecuación. Las presas pueden responder a las pistas odoríferas de los depredadores con cambios conductuales y fisiológicos. Se han propuesto tres hipótesis que explican la capacidad de las presas para detectar a sus depredadores. La *hipótesis de la presa ingenua, del multidepredador* y *del constituyente común*. La primera establece que las presas nativas ingenuas, que carecen de una historia evolutiva con depredadores no nativos, estarán bajo fuerte depredación debido a que sus respuestas antidepredadoras son inadecuadas ante el nuevo depredador. Sin embargo, las especies presa poseen la capacidad de detectar olores de depredadores aunque no compartan una historia evolutiva, como lo predice la *hipótesis del multidepredador*. La *hipótesis del constituyente común* sugiere que los olores de los depredadores comparten componentes comunes que pueden ser utilizados por las presas, aun cuando el depredador es desconocido. Posiblemente estos componentes estimulan las terminaciones nerviosas trigeminales actuando como sustancias irritantes. Con base en lo anterior surgen las preguntas: ¿responde la presa sin experiencia previa con depredadores con conductas de evitación a componentes odoríferos comunes de depredadores potenciales y naturales? ¿Su respuesta se debe a componentes comunes irritantes contenidos en las heces y no a señales específicas del depredador?

El modelo ideal para responder a estas preguntas es el conejo europeo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). El conejo doméstico proviene del europeo, que es una especie presa de diversos carnívoros, dependiente del olfato en varios contextos de su vida y responde al olor de los depredadores. Utilizando conejos adultos, se realizaron pruebas conductuales para medir la respuesta de éstos a los olores de depredadores. Los sujetos se privaron de agua o alimento de tal manera que estuvieran sedientos o hambrientos antes de la prueba, para obtener agua o alimento los conejos debían pasar por donde se encontraba el olor del depredador. Los conejos evitaron alimentarse en los comederos que contenían olor de

predadores o eucaliptol (irritante de las terminaciones nerviosas intranasales). Los resultados de este trabajo sugieren que el conejo posee mecanismos inespecíficos para la detección de depredadores naturales y potenciales, mecanismo que podría ser la estimulación de las terminaciones intranasales del nervio trigémino por sustancias comunes contenidas en las heces de depredadores, provocando cambios conductuales como evitar zonas donde se encuentran dichas heces. Sin embargo, se requiere explorar mejor esta posibilidad complementando los estudios en condiciones de campo.

I. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los ecosistemas donde cohabitan distintas especies animales, acontecen numerosas interacciones como la de presa-depredador, donde ambos participantes enfrentan grandes retos para sobrevivir, al menos el tiempo suficiente para reproducirse y dejar sus genes en la población.

Las presas presentan adaptaciones específicas que les permite reconocer, evitar y defenderse de los depredadores, por ejemplo, la sensibilidad para detectar sus olores. Se ha demostrado la habilidad de las presas para utilizar pistas odoríferas en la detección de depredadores potenciales en peces (Wisenden y Chivers 2006), salamandras (Kristen y Caitlin 2008), walabies (Blumstein y cols. 2004), ratones (Apfelbach y cols. 2005, Punzo 2005, Fendt 2006, Sündermann y cols. 2008, Borowski y Owadowska 2010) y conejos (Monclús y cols. 2005, Barrio y cols. 2010). En el laboratorio, los olores de depredadores son utilizados para producir respuestas de evitación en mamíferos (Takahashi y cols. 2005). Los olores que pueden ser detectados por las presas se encuentran en las secreciones de glándulas anales de carnívoros (Hacquemand y cols. 2010a), piel, saliva, orina y heces. Estas secreciones pueden contener kairomonas, que son compuestos químicos que transmiten información entre organismos de diferente especie y que benefician solo al individuo receptor (Brown y Macdonald 1985), éstos pueden ser detectados por las presas, que se beneficiarían al conocer la presencia del depredador y escapar con éxito de un encuentro con éste. Ante estas pistas, las presas responden con cambios fisiológicos como la elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona; también con cambios conductuales como supresión de conductas de forrajeo, alimentación, acicalamiento, cambios de hábitat o lugares donde no estén presentes los olores de depredadores (Apfelbach y cols. 2005).

Además, se ha sugerido que el marcaje odorífero es un despliegue honesto que advierte la calidad del macho ya que atrae depredadores (Viitala y cols. 1995). El marcaje odorífero territorial puede hacer a los machos vulnerables a depredación, ya que se ha observado que los machos del ratón inhiben su conducta de marcaje en respuesta al olor de un depredador, por ejemplo, un gato (Arakawa y cols. 2008). Otro mamífero que marca su territorio y contramarca en respuesta a las marcas odoríferas de coespecíficos intrusos es el castor. El

contramarcaje se reduce en respuesta a los olores de un depredador (Rosell y Sanda 2006). También se ha observado en algunas presas, una disminución en el tamaño de sus glándulas odoríferas utilizadas en el marcaje (Zhang y cols. 2003).

Uno de los posibles mecanismos para que ocurran algunas de estas respuestas en las presas, como la evitación del olor del depredador o la inhibición de las conductas de marcaje odorífero, puede ser la estimulación de las ramas oftálmica y maxilar del nervio trigémino dentro de cavidad nasal (Anton y cols. 1991). Estas terminaciones intranasales son sensibles a sustancias químicas (eucaliptol, CO₂, capsicum, pimienta, mentol, ácido acético, ácido butírico, acetona, etanol; Doty y cols. 1978, Laska y cols. 1997, Berg y cols. 1998, Hummel y cols. 2003, Albrecht y cols. 2010), responsables de las sensaciones de picor, cosquilleo, ardor, quemazón, presión y temperatura.

Las terminaciones nerviosas trigeminales poseen aferencias hacia la amígdala. Esta procesa respuestas emocionales como el miedo, respuesta crucial que permite a los animales resistir presiones ambientales como la depredación (Hacquemand y cols. 2010a). También, se ha aislado 2-feniletilamina en la orina de los carnívoros con efecto irritante en la mucosa nasal (Ferrero y cols. 2011). De la misma manera, se ha propuesto que las sustancias contenidas en las heces de depredadores actúan como olores irritantes que estimulan las terminaciones nerviosas trigeminales, más no como señales que indiquen la presencia de un depredador (Fendt 2006, Hacquemand y cols. 2010a, b).

Por el contrario, diversos estudios sugieren que el reconocimiento de los depredadores por parte de las presas es innato. Por ejemplo, la orina de cánidos y felinos indujo conductas antidepredadoras en las ratas de laboratorio, no así, cuando estas ratas se expusieron a estímulos de herbívoros y coespecíficos, el autor sugiere que sus resultados apoyan la hipótesis de que el reconocimiento de depredadores es innato (Fendt 2006). Otros estudios sugieren teorías similares en otros mamíferos como los ratones del desierto (Punzo 2005), hámsteres (Zhang y cols. 2003) y lémures (Sündermann y cols. 2008). Un estudio mostró que una población de walabies aislada de los depredadores por 130 años, dio como resultado una disminución de sus habilidades para reconocerlos (Blumstein y cols. 2004).

Además, dado que el emisor y el receptor no suelen coincidir en el mismo lugar en el momento del intercambio de información, el uso de estos olores constituye una forma segura

de obtener información del depredador, evitando los encuentros directos y por lo tanto maximizando la probabilidad de la presa de escapar con éxito y mejorar su adecuación biológica.

1. Relación presa-depredador

La depredación constituye una fuerza de selección decisiva, y probablemente constituya uno de los procesos que pueden modificar más drásticamente el éxito biológico de una especie. Para la mayoría de los animales, fracasar durante una época reproductiva o no comer durante un día puede conllevar a efectos negativos, pero errar en un encuentro con un depredador modifica de manera dramática su éxito biológico (Monclús 2007). En las especies presa han aparecido una serie de adaptaciones que incrementan la probabilidad de escapar con éxito de semejante situación. Las estrategias pueden ser morfológicas (Caro 2005), fisiológicas (Flier y cols. 1980) o conductuales (Kats y Dill 1998), y tienen que ver con alguna de las etapas de la secuencia antidepredadora.

La depredación consta de un conjunto de pautas que concluyen con el consumo de la presa. La secuencia depredadora podría resumirse en las siguientes etapas: encuentro (entendiendo como encuentro la coincidencia espacio-temporal del depredador y de la presa), detección, identificación, acercamiento, subyugación y consumo de la presa (Endler 1991). Para una presa, la probabilidad de escapar con éxito disminuye según se suceden los diferentes estadios de la secuencia depredadora (Lima y Dill 1990). Es decir, la probabilidad para una presa de salir con éxito del encuentro con un depredador, suele ser mayor en las etapas de encuentro y detección que en la de subyugación. Por lo tanto, la mayoría de las presas poseen mecanismos que actúan en las primeras etapas. Muchos de ellos consisten en la detección temprana del depredador. Si las presas pueden detectar al depredador sin que éste las detecte, las opciones de escapar con éxito se incrementarán notablemente, ya que así podrán evitar los encuentros directos, que suelen ser tan peligrosos. Para ello, se tienen que dar dos circunstancias: (1) tienen que disponer de mecanismos de reconocimiento de sus depredadores y (2) ser capaces de evaluar el riesgo actual de depredación. Una vez que las presas han valorado que existe un riesgo (3) deben desarrollar estrategias antidepredadoras adecuadas.

Se han propuesto tres hipótesis que explican la capacidad de las presas para detectar a sus depredadores. La hipótesis del constituyente común, de la presa ingenua y del multidepredador.

La *hipótesis del constituyente común* sugiere que los olores de los depredadores comparten componentes comunes que pueden ser utilizados por las presas, aun cuando el depredador es desconocido, se ha propuesto que este componente puede ser un metabolito sulfurado producto de la digestión las proteínas de la carne (Nolte y cols. 1994). Sin embargo, esta hipótesis no puede generalizarse para todas las especies, ya que algunas presas no reconocen en forma innata los olores de depredadores potenciales (Blumstein y cols. 2002).

La *hipótesis de la presa ingenua* predice que las presas nativas que carecen de una historia evolutiva con depredadores no nativos, están bajo fuerte depredación debido a que sus respuestas antidepredadoras son inefectivas ante el nuevo depredador (Cox y Lima 2006). La habilidad de las especies presa para detectar y evitar a los depredadores podría ser dependiente de la historia de vida, ecología e historia evolutiva tanto del depredador como de la presa (Hayes y cols. 2006). Sin embargo, las especies presa poseen la capacidad de detectar olores de depredadores aunque no compartan una historia evolutiva según la *hipótesis del multidepredador* (Blumstein 2005).

El reconocimiento de los depredadores mediante olores, es un tema que ha originado un gran número de investigaciones, principalmente por su importancia aplicada en el control químico de plagas (Sullivan y cols. 1988, Calder y Gorman 1991, Boag y Mlotkiewicz 1994, Burwash y cols. 1998a, b). Además, dado que el emisor y el receptor no suelen coincidir en el mismo lugar en el momento del intercambio de información, el uso de estos olores constituiría una forma segura de obtener información del depredador, evitando los encuentros directos y por lo tanto maximizando la probabilidad de la presa de escapar con éxito (Lima y Dill 1990).

1.1. Pistas químicas emitidas por los depredadores

El modelo clásico de comunicación involucra un intercambio de información entre un emisor y un receptor de señales. El emisor obtiene beneficios en su adecuación al manipular al receptor, a su vez, el receptor obtiene beneficios de la información proveniente del emisor. En

esta forma, la respuesta del receptor ejerce presión de selección sobre el emisor para incrementar la eficiencia de la transferencia de información. Al mismo tiempo, el emisor ejerce selección sobre el receptor para maximizar la detección de información en la señal. La teoría de la comunicación se desarrolló para explicar la evolución de las señales, el papel de los receptores en moldear las propiedades de una señal, como su contenido de información, confiabilidad y honestidad (Bradbury y Vehrencamp 1998 citado en Wisenden y Chivers 2006).

Sin embargo, la mayoría de información existente en el ambiente, no está constituida por señales intencionales emitidas por un emisor que se beneficie de la respuesta del receptor (discutido en Wisenden y Stacey 2005 citado en Wisenden y Chivers 2006). Esta “*información pública*” beneficia al receptor, que a diferencia de la verdadera comunicación, no necesariamente beneficia al emisor (Wisenden y Chivers 2006), este es el caso de las pistas químicas en el contexto de la relación presa-depredador.

La interacción presa-depredador produce abundante información química, ya que en las diferentes etapas de la depredación se liberan diferentes tipos de pistas químicas (Lima y Dill 1990, Smith 1992 citados en Wisenden y Chivers 2006). Si la presa descubre al depredador primero puede evitar la detección y el ataque. Varios tipos de pistas químicas le dan a la presa ventaja y le avisan de la presencia del depredador.

El primer tipo de pista química es el depredador mismo (Kats y Dill 1998 citado en Wisenden y Chivers 2006). Todas las especies tienen una firma química que es liberada de una forma pasiva en la naturaleza como un producto natural de los procesos metabólicos. Además, las kairomonas pueden informar a la presa sobre la especie de depredador y el grado de riesgo que esta especie depredadora representa (Kusch y cols. 2004 citado en Wisenden y Chivers 2006). El segundo tipo de pista química es el olor de la presa perturbada. Esta pista es liberada cuando la presa es molestada o estresada pero no herida. El tercer tipo, liberado cuando la presa es herida por los ataques del depredador, indicando no solo la presencia de éste, sino también que está forrajeando activamente y que lo está haciendo con un coespecífico, estas pistas usualmente evocan fuertes respuestas conductuales (Wisenden y Chivers 2006).

En mamíferos se han propuesto varios compuestos desencadenantes de respuestas de miedo en las presas. Uno de ellos es el 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina (TMT), presente en

las heces de zorro (Vernet-Maury 1980). Se han realizado numerosos experimentos utilizando este compuesto como repelente (Burwash y cols. 1998 a, b, Fendt y cols. 2003, Endres y cols. 2005), aunque los resultados sugieren que no todas las especies responden a este olor (Arnould y cols. 1998). En las ratas (*Rattus rattus*) en condiciones de laboratorio, el 3,3-dimetil-1,2-ditiolano (DMDIT), que se encuentra en las secreciones de las glándulas anales de los mustélidos (*Mustela* sp.) produjo resultados similares a los provocados por el TMT (Burwash y cols. 1998 a), pero en condiciones naturales ninguno de los dos produjo una respuesta clara en las ratas (Burwash y cols. 1998 b). Arnould y colaboradores (1998) observaron que ciertos ácidos grasos y un compuesto sulfurado presentes en los excrementos de perro, repelían a las ovejas. Los autores sugirieron que los ácidos grasos podrían estar enmascarando otras sustancias presentes en concentraciones mucho más pequeñas. En general, presumiblemente los compuestos sulfurados resultantes del metabolismo de la carne, son los responsables de un olor no específico de carnívoro, reconocible por las presas (Nolte y cols. 1994). Sin embargo, en algunas secreciones o excreciones de ciertos carnívoros, los compuestos sulfurados son escasos o están ausentes. Por ejemplo, la orina de los hurones (*Mustela furo*) carece de compuestos sulfurados, y la quinolina, una de las sustancias volátiles contenidas en su orina, provoca comportamiento de huida en ratones (*Mus musculus*; Zhang y cols. 2007).

1.2. Respuesta de las presas a pistas químicas de depredadores

El reconocimiento y evitación de los depredadores por parte de las presas es fundamental para su sobrevivencia. Por consiguiente, las especies presa son capaces de evaluar y responder a las pistas que señalan la presencia del depredador. Eisenberg (1983) sugiere que en los mamíferos nocturnos las pistas olfatorias son cruciales para la detección del depredador. Una serie de estudios de campo y laboratorio han demostrado que las pistas químicas de los depredadores desencadenan diversas respuestas conductuales, incluyendo la evitación del olor del depredador, conductas defensivas (Papes 2010), incremento del índice de defecación (Punzo 2005), reducción de la actividad y supresión de conductas no defensivas, por ejemplo, forrajear, comer o buscar pareja (Kats y Dill 1988, Alfelbach y cols. 2005). Además, algunas especies presa disminuyen el marcaje odorífero (Viitala y cols. 1995, Rosell y Sanda 2006,

Arakawa y cols. 2008). Otros estudios realizados en conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) mostraron una reducción en la ingesta de alimento en presencia de heces de zorro rojo (*Vulpes vulpes*), en comparación con los que se expusieron a heces de ovino y coespecíficos, se reportaron también niveles elevados de corticosterona en comparación con los animales control (Monclús 2007).

En otros estudios, los animales experimentales han sido expuestos al olor natural de piel o pelo de depredadores, mientras que otros usan orina y secreciones de glándulas anales de depredadores (Alfelbach y cols. 2005). Recientemente, algunos estudios se han enfocado en derivados sintéticos de secreciones de glándulas anales o heces como estímulo incondicionado de miedo (Wallace y Rosen 2000, Deilenberg y McGregor 2001, Blanchard y cols. 2003, Alfelbach y cols. 2005, Fendt y Endres 2008). Se ha propuesto que el uso de componentes sintéticos, en contraste con los olores naturales de depredadores, permiten la manipulación de concentraciones estándar y comparables, así como evitar resultados confusos probablemente debidos a olores de depredadores que han consumido carne de coespecíficos de las presas (Berton y cols. 1998). El compuesto 2,3,4-trimetil-1,3-tiazolina (TMT) es un derivado sintético componente de las heces de zorro rojo (*Vulpes vulpes*), que produce conductas de miedo en roedores así como aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona (Hacquemand y cols. 2010a).

En suma, los olores de los depredadores producen fuertes respuestas conductuales y fisiológicas en las especies presa, que les permiten tomar ventaja al reconocer la presencia del depredador y realizar una estrategia antidepredadora.

Cabe mencionar que las respuestas conductuales de las especies presa dependen también de la experiencia neonatal con depredadores, ya que la exposición de crías de ratón en etapa neonatal a TMT, indujo una disminución en el despliegue de conductas de miedo en la vida adulta en respuesta a este mismo compuesto (Hacquemand y cols. 2010a).

1.3. Detección de pistas químicas de depredadores por parte de las presas

Las especies presa tienen la capacidad para discriminar y reconocer un gran número de pistas químicas en el ambiente por medio del sistema olfativo, la información obtenida es esencial para reconocer a sus potenciales depredadores.

En los vertebrados incluidos los mamíferos se han descrito dos sistemas olfativos, denominados sistema olfativo principal (SOP) y accesorio o vomeronasal (SVN). Son sistemas cuyas estructuras son anatómicamente paralelas y funcionalmente distintas (Mora-Novaro y Sánchez-Criado 1992; Figura 1).

Desde los bulbos olfativos principales, la información olfatoria a través del tracto olfativo lateral alcanza al núcleo del tracto olfativo lateral, el tubérculo olfativo y los núcleos anterior y posterolateral cortical de la amígdala. La vía de proyección llega finalmente al núcleo lateral del hipotálamo (Cowan y cols. 1965, Powell y cols. 1965, Scott y Leonard 1971, Heimer 1972, Scalia y Winans 1975, 1976; Figura 1).

Los bulbos olfativos accesorios tienen proyecciones directas a los núcleos corticales posterior y medial de la amígdala, núcleo de la estría terminalis y núcleo del tracto olfativo accesorio (De Olmos y cols. 1978, Shipley y Adamek 1984, citado en Paxinos 1995; Figura 1). Esos núcleos amigdalinos a su vez, proyectan al área preóptica media e hipotálamo medial (Krettek y Price 1978a, b).

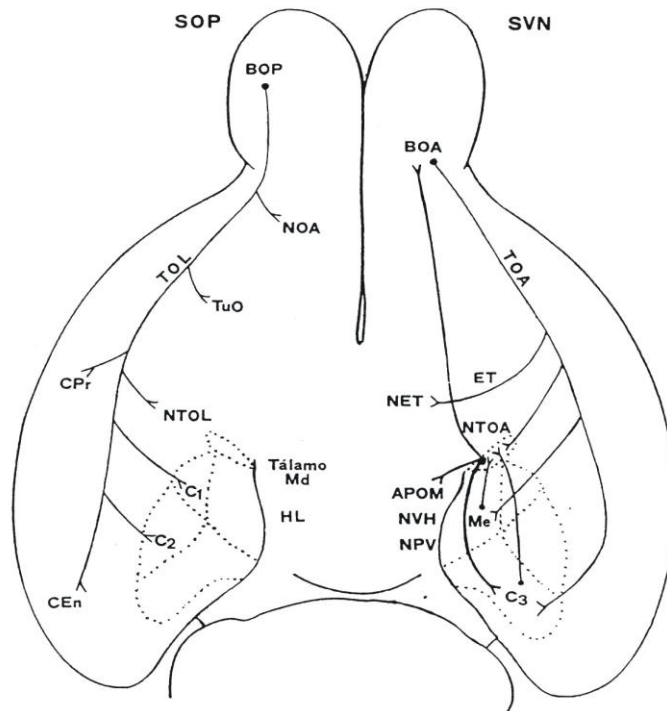


Figura 1. Esquema de un cerebro de roedor que ilustra las proyecciones primarias y secundarias de los sistemas olfativos principal y vomeronasal. Mitad izquierda: Sistema olfativo principal (**SOP**), bulbo olfativo principal (BOP), núcleo olfativo anterior (NOA), tracto olfativo lateral (TOL), tubérculo olfativo (TuO), corteza piriforme (CPr), núcleo del tracto olfativo lateral (NLOT), núcleo anterior cortical de la amígdala (C1), núcleo posterolateral cortical de la amígdala (C2), tálamo medio dorsal (Tálamo Md), hipotálamo lateral (HL); Mitad derecha: sistema vomeronasal (**SVN**), bulbo olfativo accesorio (BOA), tracto olfativo accesorio (TOA), estría terminalis (ET), núcleo de la estría terminalis (NET), núcleo del tracto olfativo accesorio (NTOA), área preóptica medial (APOM), corteza entorrinal (CEn), núcleo medial de la amígdala (Me), núcleo premamilar ventral (NPV), núcleo posteromedial de la amígdala (C3), núcleo ventromedial del hipotálamo (NVH; modificado de Kevetter y Winans 1981).

Anatomía del SOP. La cavidad nasal está separada del resto de la cavidad craneana por el hueso etmoides y dividida en dos espacios, derecho e izquierdo por el septum nasal. Los mamíferos con el sentido del olfato altamente desarrollado (roedores, lagomorfos, cérvidos, cánidos, entre otros) presentan en la parte posterior de la cavidad nasal pliegues turbinales complejos, originados del hueso etmoides y recubiertos en gran parte de su superficie por mucosa olfativa. Los mamíferos con el sentido del olfato comparativamente menos

desarrollado (primates, incluido el hombre) poseen pliegues turbinales simples y sólo su porción superior posee epitelio olfativo (Farbman 1992).

El epitelio olfativo contiene *neuronas receptoras olfativas* que son estimuladas por las moléculas contenidas en el aire cuando entran a la cavidad nasal. Las dendritas de tales células bipolares poseen cilios que alcanzan la superficie epitelial (Farbman 1992; Figura 2) y sus axones atraviesan la placa cribiforme del hueso etmoides para hacer sinapsis en los bulbos olfativos principales. Estos axones llevan la información por el nervio olfativo, primer par craneal (Shipley y cols. 1995).

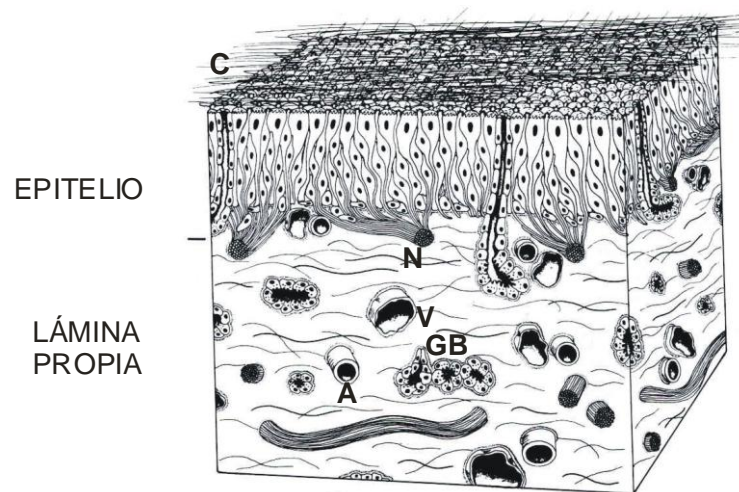


Figura 2. Esquema de la membrana mucosa olfativa constituida por epitelio y lámina propia. Los cilios largos (C) están embebidos en una capa de moco y se extienden sobre la superficie epitelial. En la lámina propia se encuentran las glándulas de Bowman (GB), paquetes de nervios olfativos (N), arterias (A) y venas (V). Los conductos de las glándulas de Bowman se abren sobre la superficie (modificado de Farbman 1992).

Los bulbos olfativos son extensiones rostrales de los hemisferios cerebrales, son estructuras pares de forma alargada y son la primera estación sináptica del sistema olfativo (Figura 3). Los bulbos olfativos se dividen en principales y accesorios.



Figura 3. Vista dorsal de la porción anterior de los hemisferios cerebrales incluyendo los bulbos olfativos de conejo.

Anatomía del SVN. Las señales que estimulan a este sistema son percibidas por el órgano vomeronasal (OVN), estructura bilateral en forma de tubo que se encuentra a cada lado del septum nasal y cubierta por una cápsula cartilaginosa. En su parte posterior, el OVN está cerrado y en su porción anterior se abre por un conducto a la cavidad nasal como en los roedores, lagomorfos y algunos primates, o al canal nasopalatino, que conecta a las cavidades oral y nasal como en los marsupiales, monotremas, carnívoros, ungulados, insectívoros y algunos primates (Wysocki 1979, Bertmar 1981, Wysocki y Meredith 1987, Meredith y O'Connell 1988). En algunos mamíferos, el canal nasopalatino no se abre en la cavidad oral sino en la cavidad nasal (Wysocki 1979).

El tamaño del OVN varía considerablemente entre los mamíferos, por ejemplo, está bien desarrollado en los roedores y los lagomorfos (Wysocki 1979). Las características del epitelio vomeronasal son semejantes a las del epitelio olfatorio principal pero las dendritas de las células sensoriales vomeronasales poseen microvellosidades en lugar de cilios (Taniguchi y Mikami 1985, citado en Farbman 1992). Los axones desmielinizados de las neuronas sensoriales perforan la lámina, formando el nervio vomeronasal, compacto y relativamente

largo. El nervio penetra la placa cribiforme del hueso etmoides y termina en la capa glomerular del bulbo olfativo accesorio (Barber y Field 1975, Barber y cols. 1978, Wang y Halpern 1982a, b citados en Halpern 1987).

El OVN y la mucosa olfatoria principal parecen recibir inervación del nervio terminal (Bojsen-Moller 1975 citado en Halpern 1987). La información recibida por el epitelio sensorial del OVN es enviada al bulbo olfativo accesorio (BOA) localizado en la superficie dorsocaudal del bulbo olfativo principal (Farbman 1992). La cavidad nasal está inervada por el nervio trigémino. Este nervio es el responsable de la sensibilidad somática de las fosas nasales (Mora-Novaro y Sánchez-Criado 1992).

Sistema trigeminal. La cavidad nasal está inervada por las ramas oftálmica y maxilar del nervio trigémino (Lang 1989 citado en Brand 2006). La rama oftálmica (nervio etmoides anterior o nervio infraorbital) inerva la porción anterior de la cavidad nasal. La rama maxilar (nervio nasopalatino) inerva la parte posterior de la cavidad nasal (Fig. 4). Las ramas oftálmica y maxilar transfieren información de estímulos dolorosos al núcleo trigeminal en la médula espinal (Anton y cols. 1991 citado en Hummel y Livermore 2002).

Los dos tipos de fibras principales del sistema trigeminal son, las fibras C (no mielinizadas) y fibras A_{delta} (mielinizadas), ambas participan en la inervación aferente quimiosensorial del epitelio respiratorio nasal (Anton y Peppel 1991, Sekizawa y Tsubone 1994 citados en Brand 2006). Las fibras C están involucradas con las sensaciones de ardor y las fibras A_{delta} con las sensaciones de escozor (Mackenzie y cols. 1975 citado en Brand 2006).

Ramas del nervio trigémino N V

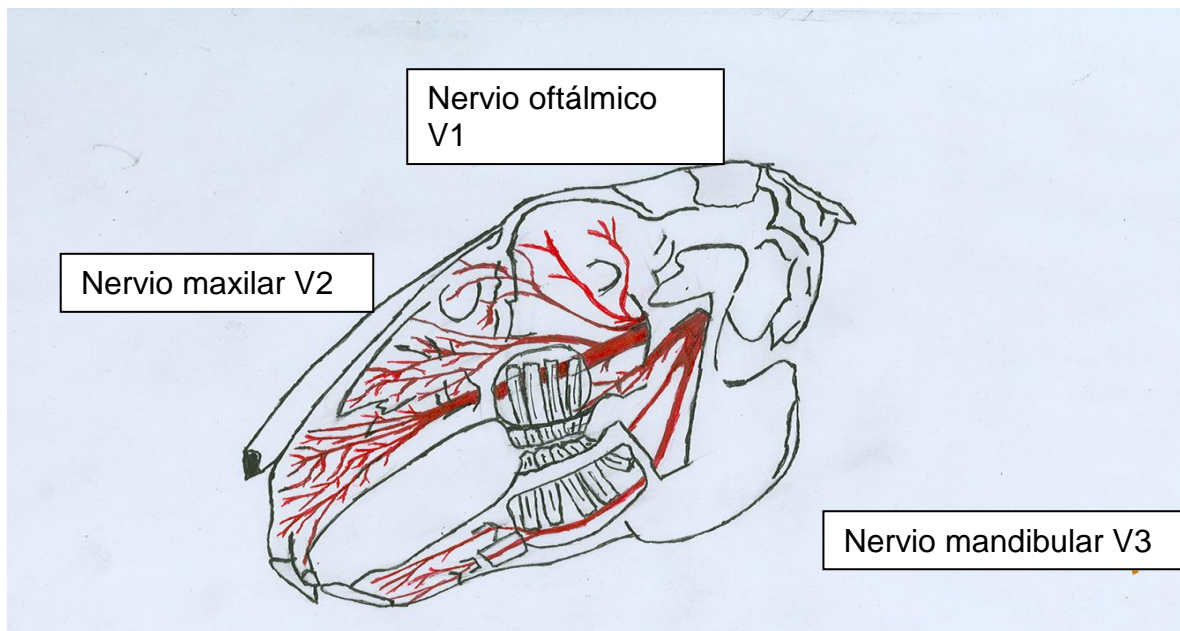


Figura 4. Esquema de una vista sagital del cráneo de un conejo que muestra la inervación trigeminal (NV) por craneal V nervio trigémino (modificado de Barone y cols. 1973).

Los axones (fibras C y A_{delta}) proyectan al núcleo sensorial trigeminal (se extiende desde la médula espinal rostral al mesencéfalo) y a los núcleos trigeminales espinal, principal y mesencefálico. Las vías aferentes nociceptivas descienden en el tracto trigeminal y terminan en el núcleo espinal. Las fibras quimiosensoriales de la cavidad nasal proyectan a la lámina superficial del núcleo espinal, particularmente los subnúcleos *caudalis* e *interpolaris* (Anton y Peppel 1991 citado en Brand 2006). La información trigeminal es transmitida a la amígdala desde el núcleo trigeminal sensorial vía el complejo parabraquial lateral (Bernard y cols. 1989 citado en Brand 2006). Las neuronas del núcleo espinal proyectan al núcleo medial posterior ventral del tálamo, la mayoría de fibras ascendentes cruzan hacia el lado contra lateral y viajan con el sistema antero lateral mientras algunas fibras ascienden en forma ipsilateral (Barnett y cols. 1995 citado en Brand 2006). La proyección que proviene del núcleo medial posterior ventral termina en la corteza somatosensorial primaria (SI). La estimulación trigeminal quimiosensorial produce activación de la corteza somatosensorial secundaria (Huttunen y cols. 1986 citado en Brand 2006), la estimulación de la cámara nasal ya sea izquierda o derecha,

produce activación bilateral en dicha corteza (Kettenmann y cols. 1996 citado en Brand 2006). La corteza somatosensorial secundaria está involucrada en la percepción del dolor (Hari y cols. 1997 citado en Brand 2006).

En términos de estimulación química, parece tener especial importancia el hecho de que los nociceptores que inervan la mucosa, a diferencia de los que inervan la piel, no están cubiertos por epitelio escamoso, así los estímulos químicos tienen casi acceso directo a las terminaciones nerviosas libres (Finger y cols. 1990 citado en Hummel y Livermore 2002). La estimulación química parece activar diversos tipos de receptores. Por ejemplo, cuando se aplica CO₂ en la mucosa de la nariz o los ojos se producen sensaciones de escozor o quemazón (Cometto-Muñiz y cols. 1997 citado en Hummel y Livermore 2002). En términos de mecanismos receptores, el CO₂ parece activar las vías aferentes nociceptivas quimiosensoriales (Komai y Bryant 1993, Steen y cols. 1995 citados en Hummel y Livermore 2002).

Los cuerpos celulares de las neuronas aferentes trigeminales se encuentran en el ganglio gasseriano. Los axones proyectan al subnúcleo del núcleo sensorial trigeminal, los núcleos trigeminales espinal, principal y mesencefálico proyectan desde la médula espinal rostral al mesencéfalo. Las vías aferentes nociceptivas descienden en el tracto trigeminal y terminan en el núcleo espinal. Las fibras quimiosensoriales de la cavidad nasal proyectan al núcleo espinal (subnúcleos caudalis e interpolaris; Anton y Peppel 1991, Anton y cols. 1991 citados en Hummel y Livermore 2002). La información trigeminal es transmitida a la amígdala vía el complejo parabraquial lateral (Bernard y cols. 1989 citado en Hummel y Livermore 2002). Las neuronas del núcleo espinal proyectan a los núcleos mediales posteriores, intralaminar y mediodorsal del tálamo. Desde el tálamo, las fibras proyectan a la corteza somatosensorial primaria. La activación trigeminal produce actividad en la corteza insular (Kettenmann y cols. 1996 citado en Hummel y Livermore 2002) y orbital ventral (Hummel y cols. 1997, Snow y cols. 1992 citados en Hummel y Livermore 2002) con una actividad más intensa en el lado derecho después de la estimulación bilateral (Hari y cols. 1997, Hummel y cols. 1997 citados en Hummel y Livermore 2002). Se ha mostrado que estas áreas están involucradas en el procesamiento de información olfatoria, y particularmente el hemisferio derecho está involucrado en amplio grado en el procesamiento de esta información

olfatoria (Zatorre y cols. 1992, Jones-Gotman y Zatorre 1993, Hummel y cols. 1995, Olsson y Cain 1996, Yousem y cols. 1999 citados en Hummel y Livermore 2002).

Tanto el sistema olfativo como el trigeminal, son activados simultáneamente por los mismos estímulos en la cavidad nasal, excepto por algunas moléculas que estimulan selectivamente al sistema olfativo. La interacción entre ambos sistemas tiene lugar a nivel periférico y central y no se ha definido completamente. Sin embargo, se han reportado cuatro posibles mecanismos mediante los cuales la actividad trigeminal puede influir el procesamiento olfativo: 1) Los sistemas interactúan a nivel central, por ejemplo, el bloqueo del sistema trigeminal facilita la actividad evocada por olores en el tálamo mediodorsal de la rata (Inokuchi y cols. 1993 citado en Hummel y Livermore 2002). 2) El sistema trigeminal puede modular la actividad del bulbo olfativo en presencia y ausencia de estimulación odorífera, el bloqueo del nervio trigémino disminuye la actividad del bulbo olfativo en el conejo e incrementa la proporción ruido-sígnal de las respuestas evocadas por olores (Stone 1969, Stone y Robert 1970 citados en Hummel y Livermore 2002). 3) La respuesta de los receptores olfativos a estímulos odoríferos puede modificarse por la liberación de sustancia P por las terminaciones nerviosas que inervan el epitelio olfativo (Finger y cols. 1990, Kratski y cols. 2000 citados en Hummel y Livermore 2002). 4) La activación trigeminal puede influir la percepción olfatoria indirectamente vía los reflejos nasales trigeminales, diseñados para minimizar la exposición potencialmente dañina a sustancias nocivas, por ejemplo, mediante la alteración de la permeabilidad nasal, o cambio en la constitución o consistencia de la capa de moco que cubre el epitelio, ello como resultado de la estimulación de las glándulas secretoras (Finger y cols. 1990 citado en Hummel y Livermore 2002).

Diversos estudios que se han concentrado en valorar la olfacción, posiblemente se han interpretado inadecuadamente debido a que se han utilizado estímulos odoríferos involucrados al mismo tiempo con el sistema trigeminal. Desde el punto de vista metodológico, cuando se elige un estímulo odorífero para valorar la percepción olfativa, debe ponerse especial atención en las propiedades trigeminales que dicho estímulo posee (Brandt 2006).

2. Modelo de estudio: el conejo doméstico

2.1. Una especie principalmente olfativa

Un modelo adecuado para probar la hipótesis que más adelante proponemos, es el conejo doméstico, ya que es una especie que utiliza el olfato en diversos contextos de su vida, tanto en sus interacciones sociales como para la supervivencia.

Las señales químicas contenidas en diferentes secreciones influyen de manera importante en su vida social. Así, la orina, heces y secreciones de diversas glándulas cutáneas contienen señales odoríferas que sirven para identificar el rango social, el estado reproductivo, también sirven para distinguir a los miembros del grupo y de los extraños, para marcar el territorio y durante la lactancia para guiar a las crías hacia los pezones (Mykytowycz 1970, Bell 1980, 1985, Hudson y Distel 1983). La localización de los pezones depende totalmente de una feromona emitida por la madre. Esta feromona induce a las crías a realizar una conducta estereotipada de búsqueda del pezón. Esta conducta es muy importante dado que el amamantamiento tiene una duración de aproximadamente tres minutos una vez cada 24 horas (Hudson y Distel 1983, Distel y Hudson 1985).

2.2. El conejo europeo responde a los olores de los depredadores

El conejo doméstico proviene del conejo europeo y es una de las presas principales de aves y reptiles (Jaksic y Soriguer 1981), así como de algunos mamíferos terrestres con los que ha compartido una historia evolutiva, por ejemplo, el lince ibérico (Delibes-Mateos y cols. 2008) y el zorro rojo (Monclús y cols. 2005). Como una especie presa, los conejos muestran una respuesta fisiológica y conductual antidepredadora en presencia del olor de las heces de algunos depredadores como el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), aún sin tener experiencia previa. La respuesta conductual en condiciones de campo, consiste en un aumento de la frecuencia de evitación del olor y de la vigilancia mientras come, así como un aumento de la frecuencia de eventos de vigilancia antes de comer (Monclús y cols. 2005).

II. ANTECEDENTES

Actualmente, se discute si la respuesta de las presas a olores de depredadores se debe a que el olor es una señal específica del depredador, o si tiene un efecto irritante para el olfato cuyo mecanismo puede ser la estimulación de las terminaciones nerviosas trigeminales intranasales.

1. Compuestos que estimulan el sistema trigeminal

Casi todos los olores presentes en el ambiente, estimulan tanto al sistema olfativo como al trigeminal. Mientras que el sistema olfativo media la percepción y calidad del olor, el sistema trigeminal, percibe sensaciones como quemazón, picor, ardor, presión al tacto y temperatura (Albrecht 2009). A pesar de que los procesos olfatorios han sido ampliamente estudiados, el substrato neurológico de la función trigeminal está pobremente entendida.

Algunos de los compuestos que se sabe que estimulan el sistema trigeminal son el eucaliptol, CO₂, el TMT (trimetil-tiazolina), capsicum, piperina, propinil-tiamida (2 PT), butil benzeno, coumarin, decil-acetato, eugenol, nonanal, octano, ácido octanico, fenil-etil-alcohol, 2-undecanone (Cometto-Muñiz 2005). Varias comparaciones de la organización y activación del cerebro por la estimulación de estímulos trigeminales puros han mostrado considerable superposición en las estructuras que median los procesos funcionales en este sistema (Boyle y cols. 2007, Hummel y cols. 2005, 2009, Iannilli y cols. 2008). Mientras que los estímulos trigeminales activan el tallo cerebral, tálamo, núcleo caudal, corteza anterior y dorso-lateral orbitofrontal, giro frontal, opérculo frontal, giro superior temporal, cingulado y giro post-central, los estímulos con olores puros comúnmente inducen activación en la corteza medial orbitofrontal, amígdala, giro parahipocampal y cerebelo exclusivamente. Se han observado superposiciones funcionales entre las redes trigeminales y olfativas en las cortezas piriforme, orbitofrontal, la región peri-insular, así como en la corteza secundaria somato-sensorial (Boyle y cols. 2007, Hummel y cols. 2009 b). La evidencia de la interacción entre ambos sistemas (olfativo y trigeminal) surgen de la comparación de sujetos normósicos y anósicos, la información mediada por el trigémino es procesada en forma diferente en presencia o ausencia del olfato intacto (Frasnelli y Hummel 2007, Iannilli y cols. 2008). Los estudios de

imagenología de ambos sistemas han mostrado que la activación trigeminal cerebral es más pronunciada que los componentes del sistema olfativo (Bensafi y cols. 2008, Boyle y cols. 2007, Hummel y cols. 2005). A pesar de esta información, no existen estudios concluyentes que permitan comprender la percepción trigeminal de sustancias químicas en el ambiente.

2. Los olores emitidos por los depredadores, ¿estimulan las terminaciones trigeminales nasales?

La detección quimiosensorial de compuestos orgánicos volátiles por los mamíferos reside en el sentido del olfato. Mientras que los olores son detectados por la mucosa olfativa que cubre la porción caudo-dorsal de la cavidad nasal vía el nervio olfativo (par craneal I), la sensación quimio-estática es detectada principalmente por las terminaciones nerviosas de la mucosa nasal vía el nervio trigémino par craneal V (Bryant y Silver 2000). Estudios recientes han mostrado que algunos compuestos, como eucaliptol, mentol, ácido acético, ácido butírico, acetona, etanol y dióxido de carbono estimulan las terminaciones trigeminales (Doty y cols. 1978, Laska y cols. 1997, Berg y cols. 1998, Hummel y cols. 2003, Albrecht y cols. 2010). Además, se han identificado sustancias en las heces de los carnívoros, por ejemplo, las heces del zorro contienen 2,4,5-trimetil-tiazolina (Hacquemand y cols. 2010a) e inducen conductas antidepredadoras, también se ha aislado 2-feniletilamina en la orina de los carnívoros (Ferrero y cols. 2011). Posiblemente estos compuestos estimulen las terminaciones nerviosas trigeminales intranasales actuando como sustancias picantes. De la misma manera, se ha propuesto que las sustancias contenidas en las heces de depredadores actúan más bien como olores irritantes que estimulan las terminaciones nerviosas trigeminales, más que como señales específicas de un depredador (Fendt y cols. 2008, Hacquemand y cols. 2010a, b).

Con base en lo anterior planteamos las siguientes preguntas ¿Responde el conejo doméstico europeo sin experiencia previa con depredadores con conductas de evitación a componentes odoríferos comunes de depredadores potenciales y naturales? ¿Su respuesta se debe a componentes comunes irritantes contenidos en las heces y no a señales específicas del depredador?

III. HIPÓTESIS

El conejo doméstico europeo sin experiencia previa con depredadores, responde con conductas de evitación a componentes odoríferos comunes de depredadores potenciales y naturales. Su respuesta se debe a componentes comunes irritantes contenidos en las heces y no a señales específicas del depredador.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el conejo doméstico europeo sin experiencia previa con depredadores, responde con conductas de evitación a componentes odoríferos comunes de depredadores potenciales y naturales y si su respuesta se debe a componentes comunes irritantes contenidos en las heces y no a señales específicas del depredador.

V. METODOLOGÍA GENERAL

Se utilizó la siguiente metodología para contrastar la hipótesis del estudio.

1. Animales

Se utilizaron 18 conejos adultos, raza chinchilla, mantenidos en condiciones de bioterio y por lo tanto sin experiencia previa con depredadores, alojados en jaulas individuales de acero inoxidable, se alimentaron con 150g/día de alimento para conejo Purina® y agua *ad libitum*. Los 18 animales estuvieron distribuidos en dos cohortes según la disponibilidad de éstos en el bioterio. La Cohorte 1 con $n=6$ (tres machos y tres hembras), de 14-16 meses de edad al inicio de las pruebas conductuales; y la Cohorte 2 con $n=12$ (cinco machos y siete hembras), de 4-7 meses de edad al inicio de las pruebas. Los animales de la Cohortes 1 no tenían parentesco, excepto por dos medios hermanos; en la Cohorte 2, solo un animal no tenía parentesco con los demás, había dos hermanos completos y los restantes eran medios hermanos.

Se realizaron tres experimentos, la Cohorte 1 se utilizó en los Experimentos 1 y 2, la Cohorte 2 en el Experimento 3. El estudio se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

2. Estímulos

En los Experimentos 1 y 2 se utilizaron como estímulos heces de dos depredadores alopátricos, zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y gato montés (*Lynx rufus*), y un simpátrico, hurón (*Mustela spp*), los tres depredadores potenciales de los conejos. Un control vacío, heces de bovino (*Bos taurus*) como estímulo neutral y eucaliptol ($C_{10}H_{18}O$, Fluka Analytical®) como estímulo trigeminal. En el Experimento 3 se utilizaron los mismos estímulos excepto las heces de gato montés.

Las heces de gato montés y zorro se obtuvieron en el Zoológico del Altiplano, San Pablo Apetatitlán, Tlaxcala. Se colectaron heces frescas, la colecta se hizo diariamente iniciando a las 8:00 horas, de abril a mayo 2012 para el Experimento 1, del 5 al 29 de octubre 2012 para el Experimento 2, y del 4 de marzo al 3 de abril del 2013 para el Experimento 3. Las heces de hurón se colectaron en un criadero ubicado en la Ciudad de México. Las heces de bovino se obtuvieron de un establo productor de leche ubicado en el municipio de Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala. Todas las heces se colectaron en bolsas de plástico ziploc y se trasladaron al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, se almacenaron a $-25^{\circ}C$ hasta su utilización en las pruebas.

VI. EXPERIMENTO 1

Este experimento se diseñó para determinar si los conejos sin experiencia previa con depredadores, respondían con conductas de evitación a los olores de las heces de depredadores potenciales y naturales, y si su respuesta se debía a componentes irritantes contenidos en dichas heces.

Se utilizaron los animales de la Cohorte 1. La prueba se realizó en un cuarto de conducta. Se utilizó una arena de observación metálica circular de 1 m de diámetro con dos

jaulas accesorias, una a cada lado y con salida hacia la arena. Cada una mide 64 x 47 x 40 cm (Fig. 5).

Se colectó una cantidad de heces suficiente (4 kg), estas heces se descongelaron, homogenizaron y congelaron nuevamente en porciones de 100 g hasta su utilización en las pruebas conductuales. Doce horas antes de la prueba, las porciones de 100 g se descongelaron sumergiéndolas en agua corriente a temperatura ambiente. En la prueba los estímulos se colocaron en un recipiente de plástico que permitía la liberación del olor.

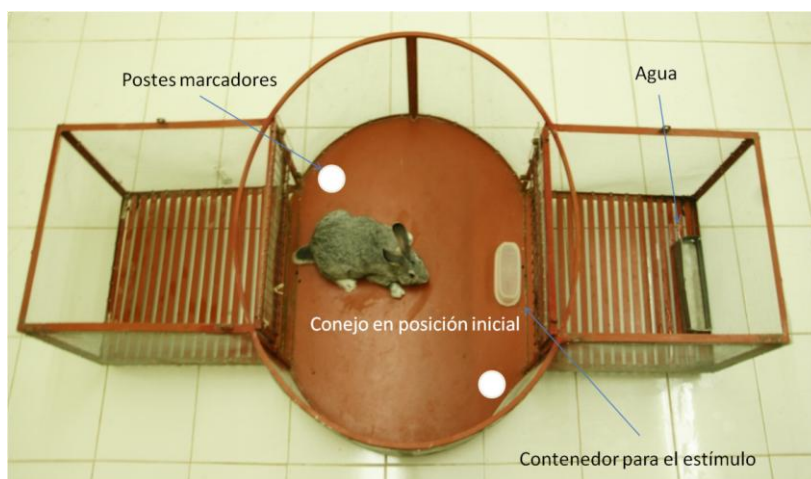


Figura. 5. Fotografía que muestra la arena de observación y colocación del recipiente con agua, contenedor de estímulos, postes para marcaje por frotamiento del mentón y la posición del conejo al inicio de la prueba.

Conductas que se registraron y su descripción: *latencia para llegar al agua* que se encontraba en la jaula accesoria (tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba y hasta que el animal llegaba al recipiente con agua), *frecuencia para beber agua* (cuando el animal introducía el hocico dentro del recipiente y bebía agua), *frecuencia de thumping* (cuando el animal golpeaba el piso de la arena con las extremidades posteriores), *frecuencia de vigilancia* (cuando el animal se erguía sobre sus cuartos traseros), *frecuencia de eventos de evitación* (cuando el animal se aproximaba al recipiente con el estímulo e inmediatamente después retrocedía o se alejaba de éste), *frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón* (cuando el animal frotaba la barbilla sobre la arena o los objetos contenidos en ésta) y *frecuencia de olfateo del estímulo* (cuando el animal acercaba la nariz hacia el estímulo y movía las narinas).

En condiciones naturales, los conejos evitan los sitios de alimentación impregnados con el olor de heces de depredadores (Barrio y cols. 2010), por ello se registró la *latencia para llegar al agua* y la *frecuencia para beber*, considerando que los animales evitarían beber agua en el sitio en la arena de observación donde se colocaron las heces de depredadores y eucaliptol. Aunque no se ha descrito la función de la conducta de *thumping* en los conejos, es posible que se trate de una señal auditiva de alarma hacia sus coespecíficos cuando el animal detecta algún tipo de riesgo, por ello se decidió medir su frecuencia como indicador de detección del olor del depredador o eucaliptol. Se ha descrito que los conejos invierten más tiempo en vigilar cuando el olor de zorro rojo está presente (Monclús 2007), por tal motivo se registró la *frecuencia de vigilancia*. Se midió la *frecuencia de eventos de evitación* debido a que se le consideró como un patrón conductual de huida del sitio donde se encontraba el olor del depredador. La conducta de marcaje por frotamiento del mentón es una conducta conspicua que el conejo realiza en condiciones naturales, que se conserva a pesar de la domesticación y fácil de medir. Debido a que se ha reportado que algunos mamíferos disminuyen su actividad de marcaje odorífero en presencia de depredadores (Rosell y Sanda 2006, Arakawa y cols. 2008), se consideró al *marcaje por frotamiento del mentón* como un indicador de que el animal detectó el olor del depredador. La alta dependencia del olfato en los conejos en diversos contextos de su vida, llevó a considerar medir la *frecuencia de olfateo del estímulo*.

3.1. Predicciones

Los conejos domésticos adultos privados de agua y sin experiencia previa con un depredador:

1. Llegarán al agua en menos tiempo en presencia de los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío, en comparación con los estímulos trigeminal (eucaliptol) y heces de depredadores.
2. Desplegarán con mayor frecuencia la conducta de evitación en respuesta a los estímulos de depredadores y trigeminal (eucaliptol) y no la presentarán ante los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío.

3. Desplegarán con mayor frecuencia la conducta de vigilancia en presencia de estímulos de depredadores y trigeminal (eucaliptol), en comparación con los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío.
4. Desplegarán con menor frecuencia la conducta de marcaje por frotamiento del mentón y olfateo del estímulo, así como con mayor frecuencia la conducta de thumping en respuesta a los estímulos de depredadores y eucaliptol, en comparación con estímulos bovino y control vacío.

3.2. Protocolo experimental

Las pruebas se organizaron de tal manera, que se pudiera evitar que el cuarto de conducta donde se realizaron quedara impregnado con olores de varios estímulos, para ello solo se utilizó un estímulo por día con los seis animales de la Cohorte 1 (Fig. 6).

Etapa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
1	Zorro	Bovino	Hurón	Vacío	Gato montés	Eucaliptol
2	Bovino	Zorro	Vacío	Hurón	Eucaliptol	Gato montés

Figura 6. Cuadro que muestra el orden en el que se presentaron los estímulos a los sujetos en cada día, en dos etapas de pruebas. Estímulos: heces de zorro, gato montés y hurón, neutral (heces de bovino), control vacío y trigeminal (eucaliptol).

El orden en el que se realizaron las pruebas conductuales con los seis sujetos dentro de una cohorte por día, independientemente del sexo, se asignó en forma aleatoria.

Habitación. Antes de iniciar las pruebas, los animales se habituaron a la arena de observación. Se colocó a cada animal durante cinco minutos dentro de la arena por tres días. Durante las pruebas los animales se privaron de agua por 15 h para motivarlos a beber agua,

dentro de una de las jaulas accesorias, tal y como se realizó en las pruebas, se colocó un bebedero similar al que se encuentra habitualmente dentro de sus jaulas en el bioterio, en la entrada de la misma jaula accesoria se colocó el recipiente vacío donde se presentaron los estímulos.

Prueba de marcaje por frotamiento del mentón. Antes de las pruebas de evitación del depredador, se midió la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón basal, para determinar si ocurre un aumento o disminución de la frecuencia en presencia del olor de un depredador. Se utilizó una arena metálica circular de 1 m de diámetro, se colocaron dos postes de madera (23.5 cm de diámetro en la base, 10 cm de altura) fijos en el piso de la arena mediante un tornillo, cada poste se cubrió con un vaso de plástico para que el sujeto realizara marcaje por frotamiento del mentón. Los vasos se cambiaron en cada prueba y para cada animal. Dentro de la arena se colocó a cada individuo durante 10 min por cinco días. Las pruebas se grabaron con una cámara de video digital Sony HANDYCAM DCR – HC32 colocada 2 m sobre la arena. Los videos se transfirieron a una PC y se analizaron.

Prueba de evitación del olor del depredador. La prueba consistió en que los animales sedientos tuvieron que pasar por donde se encontraba el olor del depredador para poder llegar al agua. Para ello, se colocó un bebedero con agua dentro de una de las jaulas accesorias de la arena, a la entrada de dicha jaula se colocó el recipiente con el estímulo neutral, vacío, trigeminal o con heces previamente descongeladas según corresponda 12 horas antes de las pruebas. El agua y el estímulo correspondiente se colocaron en forma alternada en la jaula accesoria izquierda o derecha, siempre ambas del mismo lado. La prueba consistió en colocar al conejo en el centro de la arena y observar su respuesta conductual ante el estímulo correspondiente. La duración de las pruebas fue de 10 minutos, se realizó entre las 11:00 y 12:30 horas, se grabaron para su posterior análisis.

3.3. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism. El análisis de las frecuencias para beber agua, de marcaje por frotamiento del mentón, eventos de vigilancia, *thumping*, evitación y olfateo del estímulo, se analizaron con la prueba no paramétrica Friedman para comparar entre los diferentes estímulos. La latencia para llegar al agua es una variable de naturaleza continua, sin embargo, no pasó la prueba de normalidad de Saphiro-Wilk, por lo tanto se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman. Se utilizaron cajas y bigotes para la representación gráfica de la estadística descriptiva en todos los casos. Todas las pruebas se realizaron bajo un nivel de significancia del 0.05 de dos colas. En los casos en los que el valor de P fuera menor a 0.05 se realizó una prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn.

3.4. Resultados

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en las frecuencias de algunas conductas que desplegaron los conejos en respuesta a los diferentes estímulos (Fig. 7) en los 10 minutos de prueba: conducta de marcaje por frotamiento del mentón (Friedman $F=3.043$, $N=6$, $P=0.6934$; Fig. 7A), eventos de vigilancia ($F=9.817$, $N=6$, $P=0.0806$; Fig. 7B), beber agua ($F=2.664$, $N=6$, $P=0.751$; Fig. 7C), *thumping* ($F=2.335$, $N=6$, $P=0.8011$; Fig. 7D) y olfateo del estímulo ($F=4.812$, $N=6$, $P=0.4393$ Fig. 7F). Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron en la frecuencia de eventos de evitación ($F=14.53$, $N=6$, $P=0.0125$; Fig. 7E). La prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn no mostró las diferencias entre las comparaciones, aún después de realizar un ajuste de Bonferroni, ello debido a que la n era pequeña.

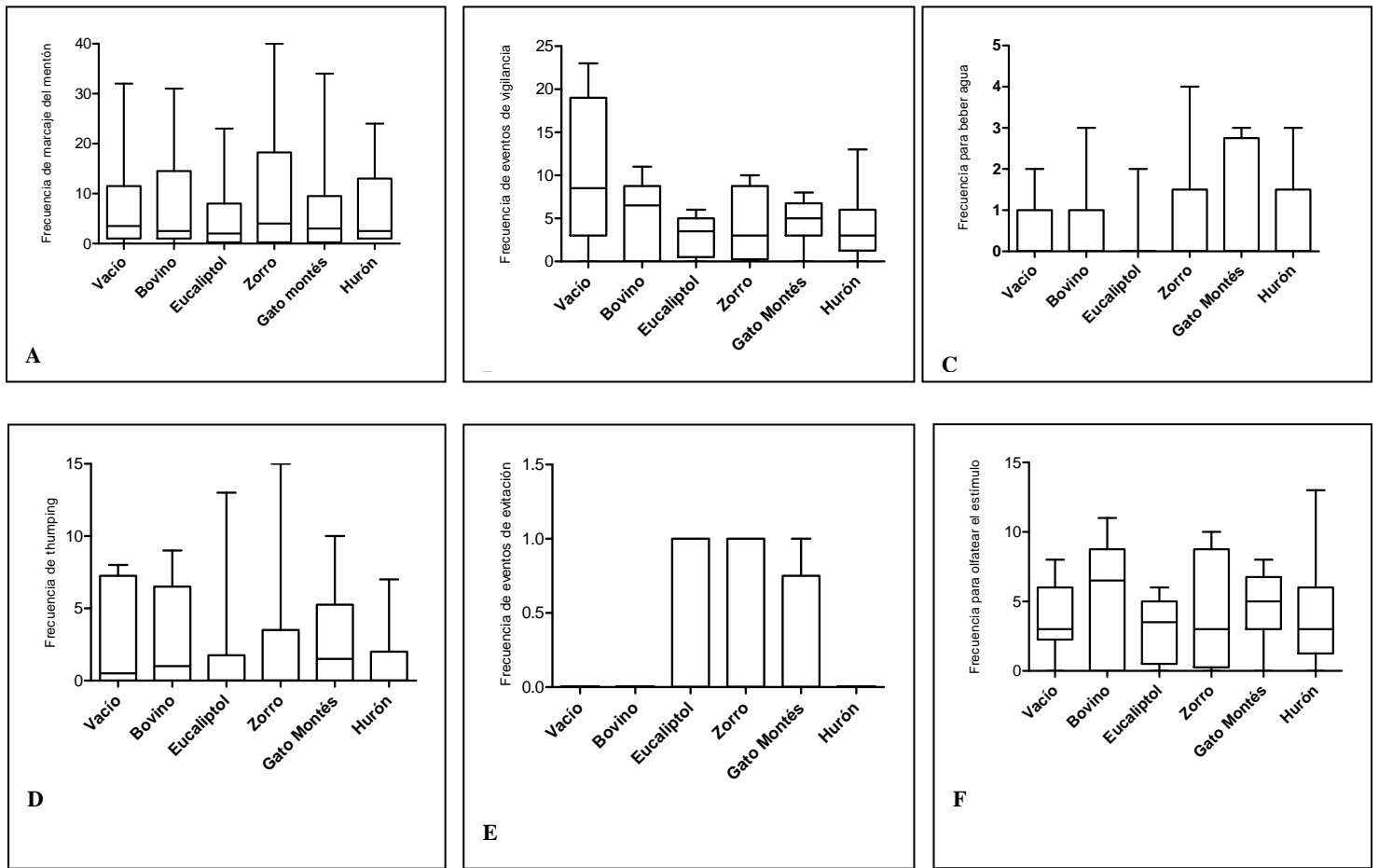


Figura 7. Frecuencia de conductas desplegadas por los conejos en respuesta a los diferentes estímulos. A) conducta de marcaje por frotamiento del mentón, B) eventos de vigilancia, C) beber agua, D) thumping, E) eventos de evitación y F) olfateo del estímulo.

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la latencia para beber agua en respuesta a los diferentes estímulos (Friedman $F=4.378$, $N=6$, $P=0.4964$; Fig. 8).

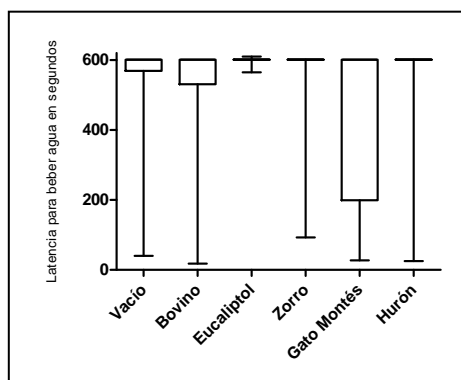


Figura 8. Latencia para beber agua ante la presencia de los diferentes estímulos.

3.5 Discusión

Con este experimento no se obtuvieron resultados concluyentes. Recapitulando, se esperaba que los animales llegarán al agua en menos tiempo en presencia de los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío y que bebieran agua con mayor frecuencia, sin embargo esto no ocurrió, incluso algunos animales no bebieron agua a pesar de varias horas previas de privación de ésta. Los resultados de las conductas de vigilancia y *thumping* no apoyan las predicciones, ya que no ocurrieron con mayor frecuencia en respuesta a olores de depredadores y eucaliptol como se esperaba. En otros estudios se ha reportado que los conejos vigilan más cuando detectan un riesgo de depredación (Monclús y cols. 2005). Referente al *thumping*, aunque no se ha descrito la función de esta conducta, posiblemente se trate de una señal auditiva de alarma que alerte a los coespecíficos de algún riesgo, por ello se estableció en una predicción que los conejos realizarían más *thumping* en presencia de los olores de depredadores o eucaliptol.

Se propuso también que los conejos disminuirían la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón en respuesta a los olores de depredadores, ya que otros estudios lo han reportado en algunas especies de mamíferos (Rosell y Sanda 2006, Arakawa y cols. 2008), aunque los resultados no apoyaron esta predicción.

Sin embargo, los resultados apoyaron la predicción de que los animales realizarían con mayor frecuencia la conducta de evitación en respuesta a los estímulos de depredadores y eucaliptol. Considerando que el eucaliptol estimula las terminaciones nerviosas intranasales (Laska y cols. 1997), los resultados sugieren que puede haber un componente irritante común en las heces de zorro y gato montés, depredadores alopatricos del conejo europeo.

Además, cabe señalar que las heces de los depredadores que se utilizaron como estímulos estuvieron congeladas por casi tres meses, transcurrido este tiempo se descongelaron para homogenizarlas y colocar 100 g en bolsas individuales, después se congelaron nuevamente. Posiblemente este manejo contribuyó a la degradación de los componentes odoríferos contenidos en las heces, ello puede explicar la falta de respuesta de los conejos en este experimento.

Con el fin de obtener resultados más concluyentes sobre el objetivo general propuesto, se realizaron modificaciones al protocolo experimental. Dado que no todos los conejos bebieron agua en presencia de los estímulos control a pesar de la privación (solo en 20% de las pruebas los conejos bebieron agua), se decidió cambiar por privación de alimento. Cabe señalar que este protocolo se ha utilizado en otros estudios realizados en nuestro propio grupo (Nicolás y cols. 2011).

VII. EXPERIMENTO 2

Este experimento se diseñó para obtener resultados más concluyentes sobre la respuesta de los conejos a los olores de las heces de depredadores potenciales y naturales, y si su respuesta se debía a componentes irritantes contenidos en dichas heces.

A diferencia del Experimento 1, las heces ya no se descongelaron, homogenizaron y congelaron nuevamente. Solo se descongelaron una sola vez 12 horas previas a la prueba. Ello para conservar mejor el olor de las heces. Además, se utilizaron 50 g en lugar de 100 g, debido a que se consideró que 50 g cumplía con el objetivo de liberar el olor. Otra diferencia en este experimento fue privar de alimento a los animales en lugar de privarlos de agua.

Se utilizó nuevamente la Cohorte 1 $n=6$ (tres machos y tres hembras) de entre 6 y 7 meses de edad.

Como en el Experimento 1, se registraron las siguientes conductas previamente descritas, ello para observar la consistencia con los resultados del Experimento 1: *frecuencias de eventos de evitación, de marcaje por frotamiento del mentón, de thumping y de olfateo del estímulo*. También la *frecuencia de vigilancia*, que en este experimento se registraron dos tipos descritos en otro estudio (Monclús 2007), leve (cuando el animal levantaba la cabeza y las orejas en posición de alerta) e intensa (cuando el animal se erguía sobre sus cuartos traseros).

Con el fin de obtener más información conductual de la respuesta de los conejos a los estímulos, se agregó el registro de otras conductas: *latencia para llegar al alimento* que se encontraba en la jaula accesoria (tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba y hasta que el animal llegaba al comedero), *cantidad de alimento consumido* (al inicio de la prueba se

administraron 200 g de alimento en el comedero, al final se pesó el alimento restante y mediante una diferencia entre ambas cantidades se determinó la cantidad consumida) y *frecuencia de acicalamiento* (cuando el animal lamía sus extremidades anteriores y las frotaba en su cara y orejas, lamía un costado de su cuerpo y área perineal).

Esta última conducta se midió considerando que, como en otros mamíferos, es parte de la actividad general de los conejos, que podría verse disminuida en presencia de olores de depredadores. Otros estudios han reportado que las presas disminuyen su actividad en presencia de depredadores (Barrio y cols. 2010).

4.1. Predicciones

Los conejos domésticos adultos privados de alimento y sin experiencia previa con un depredador:

1. Llegarán al alimento en menos tiempo y consumirán mayor cantidad de éste en presencia de los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío, en comparación con los estímulos trigeminal (eucaliptol) y heces de depredadores.
2. Desplegarán una mayor frecuencia de eventos de evitación y *thumping* ante los estímulos de depredador y trigeminal (eucaliptol) y no la presentarán ante el estímulo neutral (heces de bovino) y control vacío.
3. Desplegarán la conducta de vigilancia intensa y leve con más frecuencia en presencia de estímulos de depredadores y trigeminal (eucaliptol), en comparación con los estímulos neutral y control vacío.
4. Desplegarán con menor frecuencia la conducta de marcaje por frotamiento del mentón, olfateo del estímulo y conducta de acicalamiento en respuesta a los estímulos de depredadores y eucaliptol, en comparación con estímulo de bovino y control vacío.

4.2. Protocolo experimental

Como en el Experimento 1, la prueba se realizó en un cuarto de conducta y se utilizó la misma arena de observación. Se colocó un comedero con 200 g de alimento. El comedero era como los que se utilizan habitualmente en el bioterio (Figura 14).

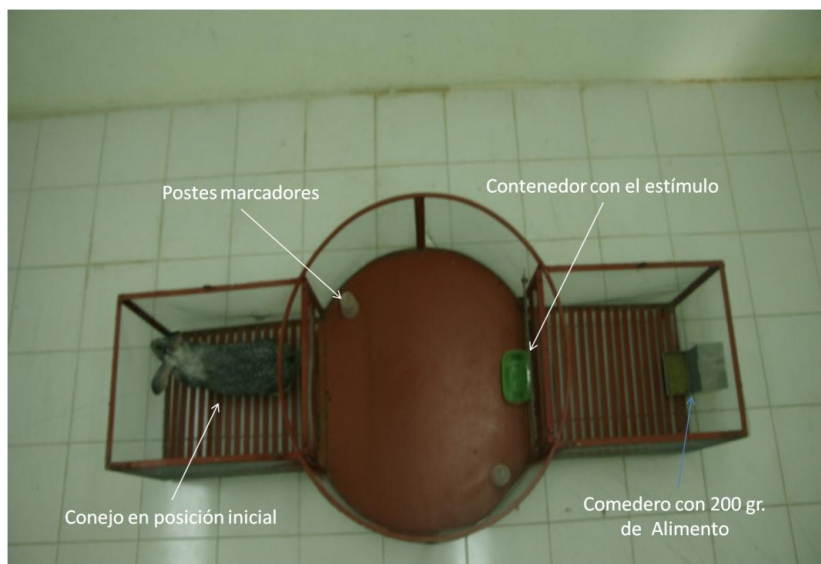


Figura 9. Fotografía que muestra la arena de pruebas con un comedero en una de las jaulas accesorias, el contenedor de estímulos, los postes de marcaje y la posición del conejo al inicio de las pruebas.

Las pruebas se organizaron de tal manera, que se pudiera evitar que el cuarto de conducta donde se realizaron quedara impregnado con olores de varios estímulos, para ello solo se utilizó un estímulo por día con los seis animales de la primera cohorte (ver Figura 6).

El orden en el que se realizaron las pruebas conductuales con los seis sujetos de la primera cohorte por día, independientemente del sexo, se asignó en forma aleatoria. Como en el Experimento 1, la habituación y las pruebas conductuales se grabaron con videocámara para su posterior análisis.

Habitación. Se realizó en forma similar que en el Experimento 1, solo que los animales se privaron de alimento por 15 horas para motivarlos a comer. Dentro de una de las jaulas accesorias se colocó un comedero igual al que tienen habitualmente en el bioterio con 200 g de

alimento. Se colocó el recipiente vacío donde se presentaron los estímulos en la entrada de la jaula accesoria.

Prueba de marcaje por frotamiento del mentón. Se realizó como en el Experimento 1.

Prueba de evitación del olor del depredador (modificada para el Experimento 2). La prueba consistió en que los animales hambrientos, tuvieron que pasar por donde se encontraba el olor del depredador para poder llegar al alimento. Para ello, se colocó un comedero con 200 g de alimento dentro de una de las jaulas accesorias de la arena. En la entrada de dicha jaula accesoria se colocó el recipiente con el estímulo neutral, vacío, trigeminal o con heces previamente descongeladas (12 horas antes de las pruebas) según correspondía. El alimento y el estímulo correspondiente se colocaron en forma alternada en la jaula accesoria izquierda o derecha, siempre comedero y estímulo del mismo lado.

La prueba consistió en colocar al conejo en el centro de la arena y observar su respuesta conductual ante el estímulo correspondiente. La duración de las pruebas fue de 10 minutos, se realizó entre las 11:00 y 12:30 horas.

4.3. Análisis de datos

Los análisis se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism. La comparación de las frecuencias de eventos de evitación, marcaje por frotamiento del mentón, eventos de vigilancia intensa y leve, *thumping*, olfateo del estímulo y acicalamiento entre los diferentes estímulos se realizó con la prueba no paramétrica de Friedman. La latencia para llegar al alimento y la cantidad de alimento consumido son variables continuas que no pasaron las pruebas de normalidad de Saphiro-Wilk, por lo tanto para su comparación entre los diferentes estímulos se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman. La representación gráfica de la estadística descriptiva se realizó con cajas y bigotes. Todas las pruebas se realizaron bajo un nivel de significancia del 0.05 de dos colas. En los casos en los que el valor de P era menor a 0.05 se realizó una prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn.

4.4. Resultados

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en las frecuencias de algunas conductas que desplegaron los conejos en respuesta a los diferentes estímulos (Fig. 10) en los 10 minutos de prueba: conducta de marcaje por frotamiento del mentón (Friedman $F=3.494$, $N=6$, $P=0.6243$; Fig. 10A), vigilancia leve ($F=7.466$, $N=6$, $P=0.88$; Fig. 10C), *thumping* ($F=3.315$, $N=6$, $P=0.6516$; Fig. 10D), olfateo del estímulo ($F=5.351$, $N=6$, $P=0.3746$; Fig. 10F) y acicalamiento ($F=3.404$, $N=6$, $P=0.637$; Fig. 10G). Aunque el análisis estadístico mostró diferencias significativas en la frecuencia de vigilancia intensa ($F=13.64$, $N=6$, $P=0.0181$; Fig. 10 B) entre los estímulos zorro y gato montés, el resultado no apoya las predicciones, ya que no se esperaban diferencias entre estos dos estímulos. También se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de eventos de evitación ($F=14.69$, $N=6$, $P=0.0118$; Fig. 10E). Sin embargo, la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn y el ajuste de Bonferroni no mostraron las diferencias entre las comparaciones.

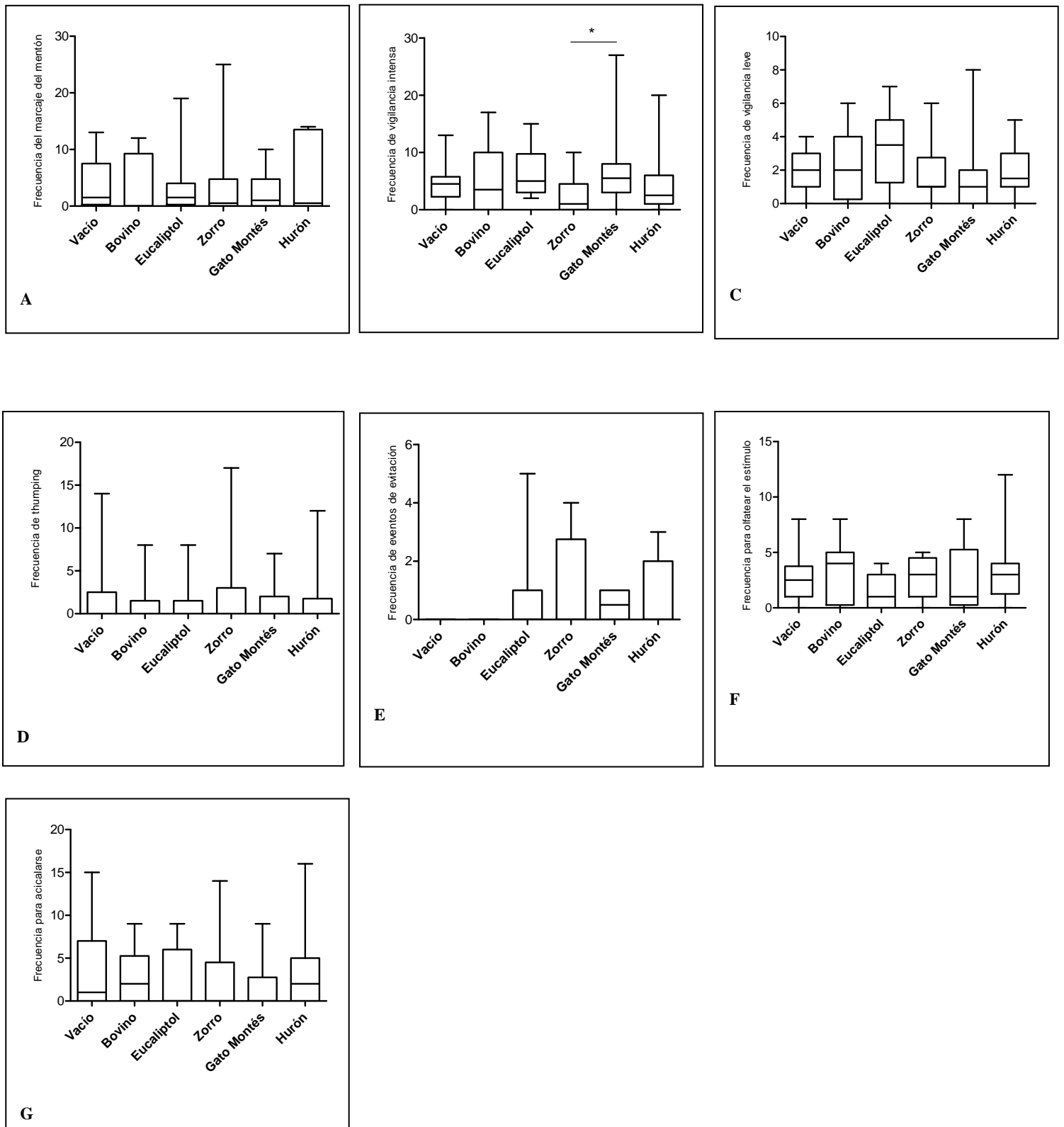


Figura 10. Frecuencia de conductas desplegadas por los conejos en respuesta a los diferentes estímulos. A) conducta de marcaje por frotamiento del mentón, B) eventos de vigilancia intensa y C) leve, D) *thumping*, E) eventos de evitación, F) olfateo del estímulo y G) acicalamiento.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en la latencia para llegar al alimento (Friedman $F=2.792$, $N=6$, $P=0.732$; Fig. 11) en los 10 minutos de prueba.

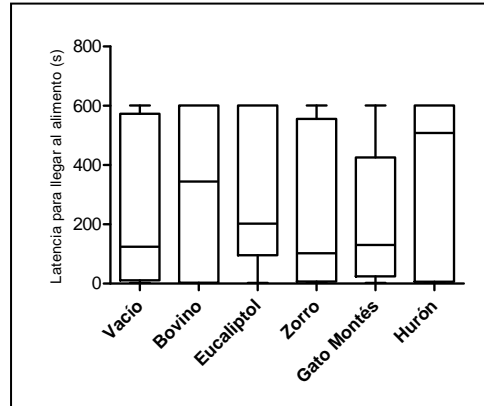


Figura 11. Latencia para llegar al alimento ante los diferentes estímulos.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el consumo de alimento (Friedman $F=13.28$, $N=6$, $P=0.0209$; Fig. 12) en los 10 minutos de prueba. Aunque la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn no mostró las diferencias entre las comparaciones.

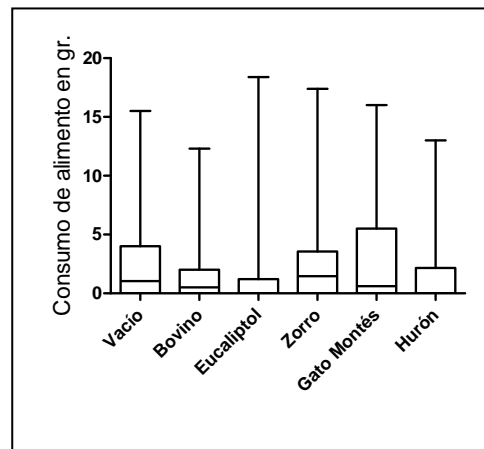


Figura 12. Consumo de alimento ante los diferentes estímulos.

4.5. Discusión

A pesar de que los resultados no fueron concluyentes, cabe señalar que fueron consistentes con los del Experimento 1. Los resultados sugieren que los conejos prefirieron evitar “o huir” del sitio con olores de depredadores y eucaliptol.

Además, es importante señalar que fue adecuado medir variables adicionales al Experimento 1 para obtener más información sobre la respuesta de los conejos a olores de depredadores y eucaliptol, ya que a pesar de ello los resultados siguen siendo consistentes. Se obtuvieron mejores resultados con la privación de alimento que con la de agua, ya que se logró el objetivo de motivar a los animales a comer.

No haber obtenido resultados que apoyen o rechacen la hipótesis, llevó a diseñar un nuevo experimento utilizando otra cohorte de animales. Se puso especial atención en la conservación de componentes odoríferos de las heces y se dio a los animales cuatro opciones para elegir donde alimentarse.

VIII EXPERIMENTO 3

Con el objetivo de obtener resultados concluyentes que permitan probar la hipótesis del estudio, se diseñó el Experimento 3. En éste se decidió eliminar las heces de gato montés con el fin de tener solo un estímulo de depredador alopatrico (heces de zorro gris) y uno simpátrico (hurón). Se utilizaron solo 10 g de heces, cantidad similar a una deyección de heces de zorro y hurón (éstas pesan entre 10 y 15 g), este dato se obtuvo de pesar deyecciones individuales en el zoológico y en el criadero de hurones donde se obtuvieron. Además, se consideró que es una cantidad suficiente para evocar la respuesta de los conejos (Monclús y cols. 2005).

Se utilizó la Cohorte 2 de $n=12$ (cinco machos y siete hembras) de entre 6 y 7 meses de edad.

Las heces se colectaron primero en hojas de papel aluminio de aproximadamente 20 por 20 cm en las que se envolvieron, ello para evitar la volatilización de los componentes odoríferos (comunicación personal del Dr. Heiko G Rödel), después se colocaron en bolsas de

plástico ziploc y fueron trasladadas al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta para su almacenamiento a -25°C hasta su utilización en las pruebas.

Las heces se descongelaron a temperatura ambiente 12 horas antes de la prueba según correspondía. En la prueba los estímulos se colocaron en un recipiente de plástico que permitía la liberación del olor, éste medía 4 cm de diámetro por 3 cm de altura.

VARIABLES QUE SE MIDIERON: *consumo total de alimento de los 4 comederos* ante los diferentes estímulos, *consumo de alimento en el comedero uno* donde se colocó el estímulo y la *cantidad de alimento consumido en cada uno de los cuatro comederos* cuando el estímulo se colocó en el comedero D1 o I1. Se registraron las *frecuencias de marcaje por frotamiento del mentón*, *eventos de vigilancia intensa y leve*, *thumping*, *eventos de evitación* y *cabriolas* (cuando el conejo corría pequeñas distancias y saltaba sobre sus cuatro extremidades mientras impulsaba la cabeza hacia atrás).

Como el acicalamiento medido en el Experimento 2, esta última conducta se midió considerando que es parte de la actividad general de los conejos, que podría verse disminuida en presencia de olores de depredadores, ya que se ha reportado que las presas disminuyen su actividad en presencia de depredadores (Barrio y cols. 2010).

5.1. Predicciones

Los conejos domésticos adultos privados de alimento y sin experiencia previa con un depredador:

1. Preferirán alimentarse en los comederos que solo contengan alimento, estímulo neutral (heces de bovino) o control vacío, y evitarán alimentarse en los comederos que contengan los estímulos aversivo (eucaliptol) y depredador.
2. Desplegarán la conducta de evitación ante los estímulos de depredador y trigeminal (eucaliptol) y no la presentarán ante los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío.
3. Desplegarán la conducta de vigilancia intensa y leve con mayor frecuencia en presencia de estímulos de depredadores y trigeminal (eucaliptol), en comparación con los estímulos neutral (heces de bovino) y control vacío.

4. Desplegarán con menor frecuencia la conducta de marcaje por frotamiento del mentón y cabriolas, así como una mayor frecuencia la conducta de *thumping* en respuesta a los estímulos de depredadores y eucaliptol, en comparación con estímulo de bovino y control vacío.

5.2. Protocolo experimental

Se utilizó la misma arena de observación. Se colocaron cuatro comederos, dos en cada una de las jaulas accesorias (Fig. 13). A cada comedero se le colocó 200 g de alimento.



Figura 13. Fotografía que muestra la arena de pruebas, la colocación de dos comederos en el lado izquierdo identificados como I1 e I2, y dos colocados en el lado derecho identificados como D1 y D2. Los estímulos se colocaron en I1 o D1 según correspondía para cada animal. Se muestran también acercamientos del comedero con el contenedor de estímulos dentro, así como el contenedor de estímulos.

Las pruebas se organizaron de tal manera, que se pudiera evitar que el cuarto de conducta donde se realizaron quedara impregnado con olores de varios estímulos, para ello solo se utilizó un estímulo por día con los doce animales de la cohorte dos.

El orden en el que se realizaron las pruebas conductuales con los doce sujetos independientemente del sexo, se asignó en forma aleatoria.

Habitación. Se realizó como en los Experimentos 1 y 2, solo que se colocaron dos comederos dentro de cada una de las dos jaulas accesorias, cada uno con 200 g de alimento. Los animales se privaron de alimento por 15 h para motivarlos a comer.

Prueba de marcaje por frotamiento del mentón. Se realizó de la misma forma que en los Experimentos 1 y 2.

Prueba de evitación del olor del depredador (modificada para el Experimento 3). La prueba consistió en que los animales privados de alimento debían elegir uno de los cuatro comederos para alimentarse, ya que en uno de éstos se colocó el contenedor de estímulo según correspondía. El contenedor con el estímulo se colocó en I1 o D1 según correspondía para cada animal. La prueba consistió en colocar al conejo en el centro de la arena y observar su respuesta conductual ante el estímulo correspondiente. La duración de las pruebas fue de 10 minutos, se realizó entre las 11:00 y 12:30 horas, se grabaron para su posterior análisis.

5.3. Análisis de datos

La comparación entre los diferentes estímulos en las frecuencias de marcaje por frotamiento del mentón, eventos de evitación, eventos de vigilancia intensa y leve, *thumping* y cabriolas, se realizó con la prueba no paramétrica de Friedman. La representación gráfica de la estadística descriptiva se realizó con cajas y bigotes. Todas las pruebas se realizaron bajo un nivel de significancia del 0.05 de dos colas. Para evaluar el consumo de alimento entre los cuatro comederos ante los diferentes estímulos, se realizó una prueba paramétrica ANOVA de dos vías considerando dos factores: a) estímulo, con cinco niveles (vacío, bovino, eucalipto, zorro y hurón); y b) lado, con dos niveles (izquierda o derecha). Las pruebas se corrieron con un nivel de confiabilidad del 0.05 de dos colas. Se utilizaron barras con medias \pm desviación estándar de dos colas para la estadística descriptiva.

5.4. Resultados

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en algunas de las frecuencias de conductas desplegadas por los conejos en respuesta a los diferentes estímulos en 10 minutos de prueba (Fig. 14): conducta de marcaje por frotamiento del mentón (Friedman $F=2.929$, $N=5$, $P=0.5697$; Fig. 14A), eventos de vigilancia intensa ($F=1.091$, $N=5$, $P=0.8957$; Fig. 14B), *thumping* ($F=0.6835$, $N=5$, $P=0.9534$; Fig. 14D) y cabriolas ($F=1.667$, $N=5$, $P=0.7968$; Fig. 14F). Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de vigilancia leve ($F=9.913$, $N=5$, $P=0.0419$, prueba post-hoc comparación múltiple de Dunn bovino vs zorro ($P=0.0027$ con ajuste de Bonferroni; Fig. 14C). También en la frecuencia de eventos de evitación ($F=38.59$, $N=5$, $P=0.0001$, post-hoc comparación múltiple de Dunn vacío vs eucaliptol $P=0.0002$, vacío vs zorro $P=0.002$ y bovino vs eucaliptol $P=0.0003$, todas estas pruebas post-hoc con ajuste de Bonferroni; Fig. 14E).

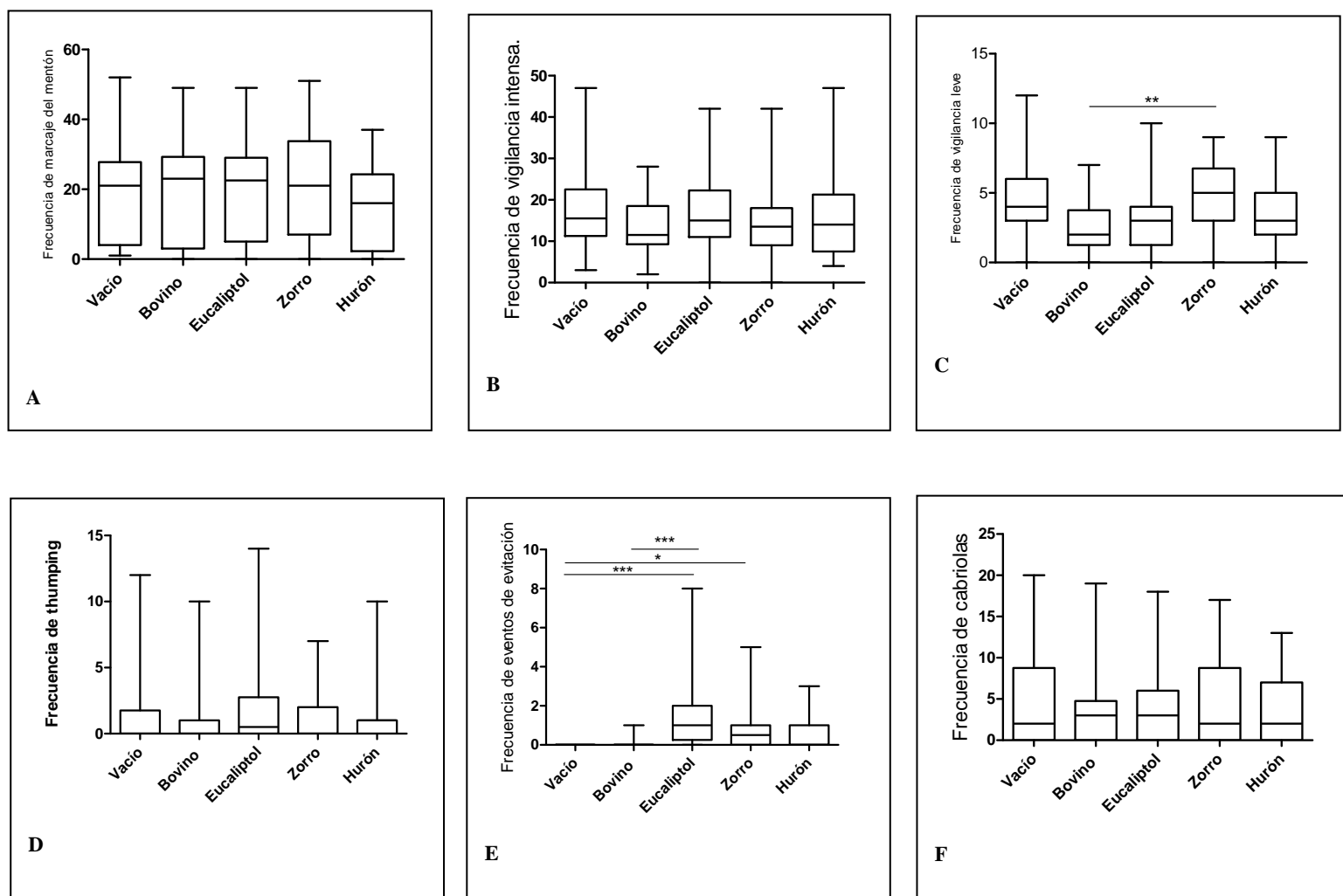


Figura 14. Frecuencia de conductas desplegadas por los conejos en respuesta a los diferentes estímulos. A) Conducta de marcaje por frotamiento del mentón, B) eventos de vigilancia intensa y C) leve, D) *thumping*, E) eventos de evitación y F) cabriolas.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el consumo de alimento entre los cuatro comederos con el tratamiento vacío (ANOVA de dos vías $F=4.06$, $Df=3,44$ $P=0.0125$; Fig. 15A). Se encontraron diferencias estadísticas significativas con el estímulo control de heces de bovino (2way ANOVA $F=3.63$, $Df=3,44$ $P=0.0200$; Fig. 15B). Se encontró también efecto en el consumo de alimento en la prueba realizada con el estímulo eucaliptol (ANOVA de dos vías $F=4.12$, $Df=3,44$ $P=0.016$; Fig. 15C). En cuanto al efecto en el consumo

de alimento entre los cuatro comederos con el olor de zorro, no se encontraron diferencias estadísticas significativas, aunque éstas fueron cercanas a la significancia (ANOVA de dos vías $F=2.23$, $Df=_{3,44}$ $P=0.0986$; Fig. 15D). Sin embargo, existe una interacción entre los factores $P=0.0215$. También hubo efecto en el consumo de alimento con el olor de hurón (ANOVA de dos vías $F=5.64$, $Df=_{3,44}$ $P=0.0023$; Fig. 15E). En todos los casos el ajuste de Bonferroni no mostró las diferencias entre los cuatro comederos.

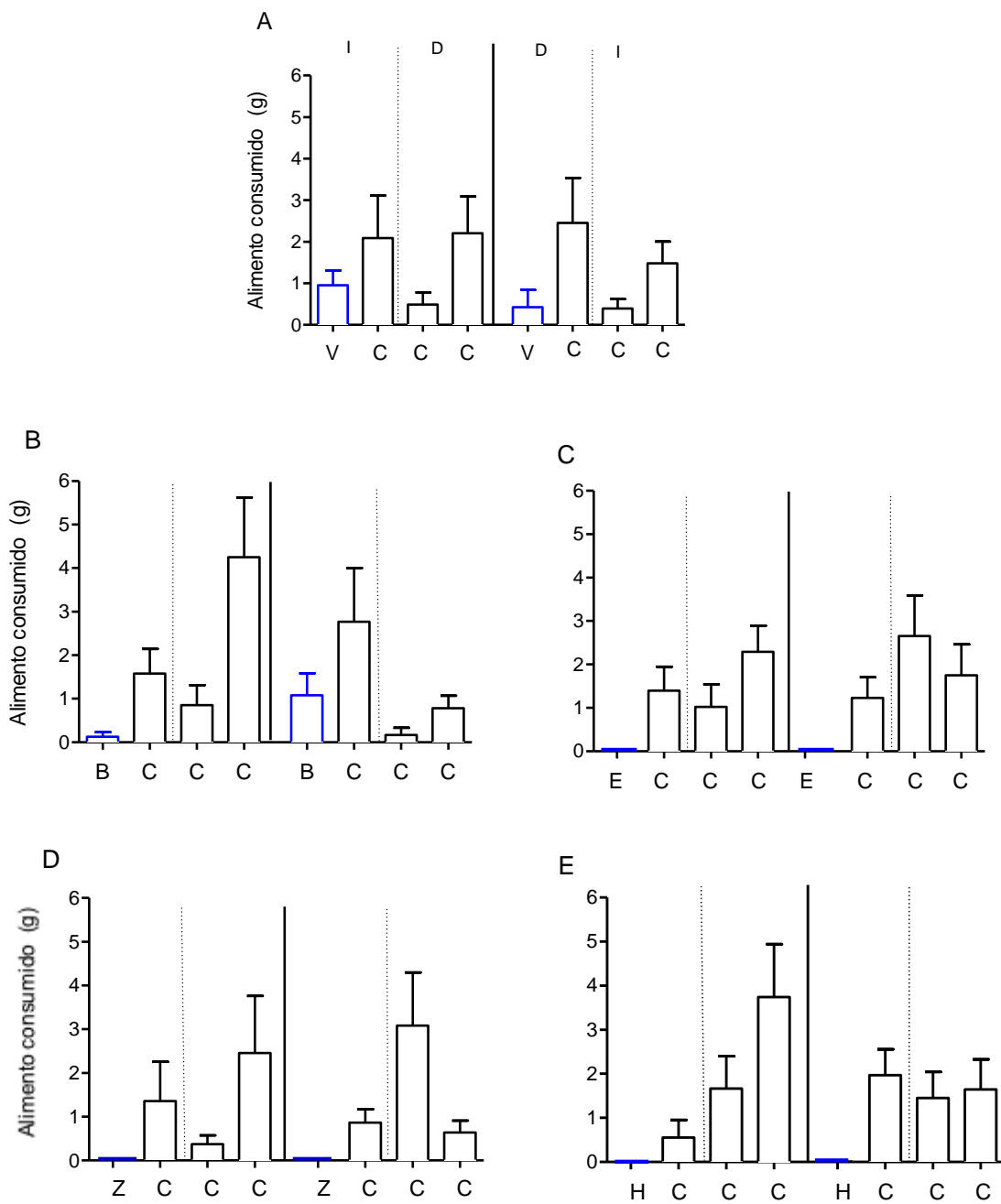


Figura 15. Consumo de alimento en respuesta a los diferentes estímulos, cada barra representa un comedero, la barra azul representa el comedero donde se colocó el estímulo, cada gráfica tiene dos paneles divididos con una línea continúa, cada uno representa el sitio en el que se colocó el estímulo del lado izquierdo (I) o derecho (D) dentro de la arena de pruebas. Paneles 15A) vacío, 15B) bovino, 15C) eucaliptol, 15D) zorro y 15E) hurón.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el consumo total ante los diferentes estímulos (Friedman test $F=1.356$, $N=5$, $P=0.8517$).

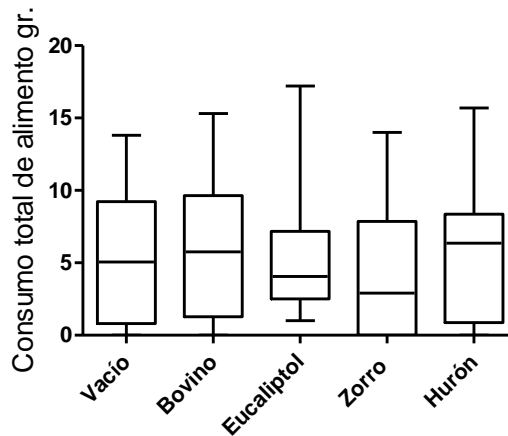


Figura 16. Consumo total de alimento de los 4 comederos ante los diferentes estímulos.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el consumo de alimento en el comedero de la posición uno en donde se encontraba el alimento (Friedman $F=23.40$, $N=5$, $P=0.0001$) ante los diferentes estímulos, la prueba post-hoc de Dunn no mostró las diferencias entre las comparaciones.

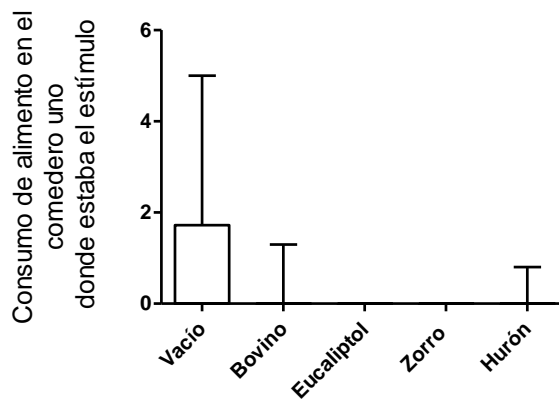


Figura 17. Consumo de alimento en el comedero uno donde se colocó el estímulo.

5.5. Discusión

Los resultados de este experimento fueron consistentes con los de los Experimentos 1 y 2. Los resultados sugieren que los conejos prefirieron evitar “o huir” del sitio con olores de depredadores y eucaliptol. A pesar de que los conejos se mantuvieron en condiciones de bioterio sin experiencia con depredadores, desplegaron la conducta de huida cuando aparentemente detectaron algún componente en las heces, ello apoyaría la *hipótesis del constituyente común* (Dickman y Doncaster 1984, Nolte y cols. 1994). Este componente podría ser un compuesto sulfurado resultado de la digestión de carne con efecto irritante de la mucosa nasal, estimulando las terminaciones nerviosas intranasales del sistema trigeminal.

Los resultados de este experimento, sugieren que los conejos detectaron la presencia de heces de depredadores alopátricos y simpátricos, así como el eucaliptol, ya que de las cuatro opciones que se les presentó para alimentarse, prefirieron hacerlo del sitio libre de estímulos. Aunque se esperaba que el estímulo control con heces de bovino no tuviera efecto en el consumo de alimento, los conejos tampoco se alimentaron del comedero con este estímulo. Se ha reportado que los conejos evitan alimentarse en sitios contaminados con heces de gato doméstico, hurón y zorro rojo (Barrio y cols. 2010). La respuesta observada fue independiente de la experiencia como lo han mostrado otros estudios (Boag y Mlotkiewicz 1994, Pongrácz y Altbäcker 2000).

Cabe señalar que pocos estudios se han realizado con olores de depredadores alopátricos del conejo, como el león (Boag y Mlotkewic 1994) y el gato marsupial (Barrio y cols. 2010).

IX. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados sugieren que el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), posee un mecanismo para el reconocimiento de olores de sus potenciales depredadores alopátricos, como el zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y gato montés (*Lynx rufus*), además de reconocer a uno de sus depredadores simpátricos como el hurón (*Mustela sp*). Asimismo responde con conductas de huida a eucaliptol, estimulante del nervio trigémino, responsable de detectar las sensaciones

desagradables como el picor en la nariz. Los conejos responden aumentando la conducta huida a dichos olores, además prefieren no alimentarse en los comederos contaminados con olor de depredador o eucaliptol. Por el contrario no encontramos incremento en dichas conductas con heces de herbívoro, bovino (*Bos taurus*) y contenedor vacío.

En nuestro experimento los conejos, mantenidos en condiciones de bioterio, no tuvieron previo contacto con olores de depredadores, herbívoro o eucaliptol. Por lo tanto, la respuesta que observamos fue independiente de la experiencia previa como lo han mostrado otros estudios (Apfelbach y cols. 2005, Monclús y cols. 2005, Punzo 2005, Fendt 2006, Sündermann y cols. 2008, Borowski y Owadowska 2010, Blumstein y cols. 2004). Ello sugiere que existe una pista química en las heces de carnívoros no específica que los conejos son hábiles de evaluar como una señal de peligro (*hipótesis del componente en común*; Dickman y Doncaster 1984, Nolte y cols. 1994). Se ha propuesto que los compuestos sulfurosos, subproductos de la digestión de proteínas animales, son responsables de este olor compartido entre carnívoros. Los conejos poseen la habilidad para distinguir entre pistas químicas de depredadores naturales y depredadores no naturales, evitando el olor de zorro gris, gato montés, hurón y el control aversivo, en cambio no mostraron despliegue de conducta de huida por la pista odorífera de heces de bovino y contenedor vacío. También existe evidencia que las especies presa responden de forma adaptativa a olores de depredadores no específicos con los que ellos nunca han estado en contacto (Stodart 1982, Calder y Gorman 1991, Barreto y McDonald 1999, ver Blumstein y cols. 2002, Barrio y cols. 2010). Los conejos mostraron una preferencia por no alimentarse donde se encuentra el estímulo olfativo aversivo o depredador, en cambio, prefieren alimentarse en los comederos donde no se colocó el odorante (comedero con contenedor de estímulo vacío). En este estudio se observaron respuestas conductuales al olor aversivo y de depredadores, mostrando conductas de huida (evitación) cuando detectan estos olores. Esta conducta no se presenta con el control vacío y el estímulo de herbívoro. Hallazgos similares se han reportado en otros estudios (Monclús y cols. 2005) en donde se expone a los conejos europeos a heces de zorro rojo (*Vulpes vulpes*), estudio donde reporta cambios conductuales, como un aumento en la vigilancia y conductas de huida.

En el experimento uno los conejos no evitaron el olor de bovino y control vacío. Tampoco el olor del hurón, que es su depredador natural y han coexistido en su historia evolutiva (Glen y Dickman 2007). Sin embargo, la falta de respuesta al olor de hurón en este experimento podría deberse a que las heces estuvieron congeladas por tres meses, se descongelaron y se congelaron nuevamente, lo que pudo haber tenido algún efecto en las sustancias volátiles de las heces. En los Experimentos 2 y 3 en los que las heces solo se congelaron una vez, si se obtuvo respuesta al olor del hurón.

La conducta de evitación lleva un costo significativo en términos de perder oportunidades de uso de recursos con consecuencias en la adecuación individual. Esta selección podría favorecer detección más refinada de la identidad del depredador. A pesar de esta predicción la respuesta de muchas presas tiende a ser una evitación generalizada al olor de los depredadores (Apfelbach y cols. 2005), más que una respuesta especie específica a un depredador en particular, así la experiencia parece innecesaria (Hayes y cols. 2006).

X. CONCLUSIÓN FINAL

El objetivo de este estudio, fue determinar si el conejo doméstico europeo sin experiencia previa con depredadores, respondía con conductas de evitación a componentes odoríferos comunes de depredadores potenciales y naturales y si su respuesta se debía a componentes comunes irritantes contenidos en las heces y no a señales específicas del depredador. Los resultados sugieren que los conejos domésticos aun sin experiencia previa con depredadores alopátricos o simpátricos, detectan y evitan su olor.

Los conejos respondieron de igual forma al eucaliptol, compuesto que estimula las terminaciones nerviosas del nervio trigémino, ello sugiere que las heces de depredadores potenciales y naturales pueden contener componentes irritantes comunes a los carnívoros.

No obstante, las respuestas anti-depredador pueden ser modificadas fuertemente bajo condiciones más complejas. Por ello, posteriormente se requerirá realizar estudios conductuales y fisiológicos en condiciones de campo.

XI. REFERENCIAS

Albrecht J, Kopietz R, Frasnelli J, Wiesmann M, Hummel T, Lundstrom JN (2010) The neuronal correlates of intranasal trigeminal function – An ALE meta-analysis of human functional brain imaging data. *Brain Res Rev* 62:183-196.

Anton F, Peppel P (1991) Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neurosci* 41:617-628.

Anton F, Peppel P, Euchner I, Handwerker HO (1991) Controlled noxious chemical stimulation: responses of rat trigeminal brainstem neurones to CO₂ pulses applied to the nasal mucosa. *Neurosci Lett* 123:208-211.

Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, Hayes RA, McGregor IS (2005) The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1123-1144.

Arakawa H, Blanchard DC, Arakawa K, Dunlap C, Blanchard RJ (2008) Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1236-1248.

Arnould C, Malosse C, Signoret JP, Descoins C (1998) Which chemical constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep? *J Chem Ecol* 24:559–576.

Barnett EM, Evans GD, Sun N, Perlman S, Cassell MD (1995) Anterograde tracing of trigeminal afferent pathways from the murine tooth pulp to cortex using herpes simplex virus type I. *J Neurosci* 15:2972-2984.

Barber PC y Field PM (1975) Autoradiographic demonstration of afferent connections of the accessory olfactory bulb in the mouse. *Brain Res* 85: 201-203.

Barber PC, Parry DM, Field PM y Raisman G (1978) Electron microscope autoradiographic evidence for specific transneuronal transport in the mouse accessory olfactory bulb. *Brain Res* 152: 283-302.

Barone R, Pavoux C, Blin PC, Cuq P (1973) *Atlas D'Anatomie du Lapin*. Masson & C^{ie} Éditeurs, Paris. Pp 159.

Barreto G, McDonald DW (1999) The response of water voles, *Arvicola terrestris*, to the odour of predators. *Anim Behav* 57:1107–1112.

Barrio IC, Bueno G, Banks PP, Tortosa FS (2010) Prey naiveté in an introduced prey species: the wild rabbit in Australia. *Behav Ecol* 21:986-991.

Bell DJ (1980) Social olfaction in lagomorphs. *Symp Zool Soc Lond* 45:141-164.

- Bell DJ (1985) The rabbits and hares: order Lagomorpha. En Brown R, MacDonald D (Eds) Social odours in mammals. Vol 1, Clarendon Press, Oxford. Pp 507-530.
- Bensafi M, Iannilli EG, Hummel T (2008) Neural coding of stimulus concentration in the human olfactory and intranasal trigeminal system. *Neurosci* 54:832-838.
- Berg J, Hummel T, Huang G, Doty RL (1998) Trigeminal impact of odorants assessed with lateralized stimulation. *Chem Senses* 23:587.
- Bernard JF, Peschanski M, Besson JM (1989) A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neurosci Letters* 100:83-88.
- Bertmar G (1981) Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35: 359-366.
- Berton V, Belzung C, Vogel E (1998) Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiol Behav* 65:247-254.
- Blanchard C, Griebel G, Blanchard RJ (2003) The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European J Pharmacol* 463:97-116.
- Blumstein D, Daniel JC, Springett BP (2004) A test of the multi-predator hypothesis: rapid loss of antipredator behavior after 130 years of isolation. *Ethology* 110:919-934.
- Blumstein D, Melissa M, Daniel JC, Andron JG, Griffin AS, Evans CS (2002) Olfactory predator recognition: wallabies may have to learn to be wary. *Anim Conserv* 5:87-93.
- Blumstein D (2005) The multipredator hypothesis and the evolutionary persistence of antipredator behavior. *Ethology* 112:209-217.
- Boag B, Mlotkiewicz JA (1994) Effect of odor derived from lion faeces on behavior of wild rabbits. *J Chem Ecol* 20:631-637.
- Bojsen-Moller F (1975) Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *J Comp Neurol* 159:245-256.
- Borowski Z, Owadowska E (2010) Field vole (*Microtus agrestis*) seasonal spacing behavior: the effect of predation risk by mustelids. *Naturwissenschaften* 97:487-493.
- Boyle JA, Heinke M, Gerber J, Frasnelli J, Hummel T (2007) Cerebral activation to intranasal chemosensory trigeminal stimulation. *Chem Senses* 32:343-353.
- Boyle JA, Heinke M, Gerber J, Frasnelli J, Hummel T (2007) Cerebral activation to intranasal chemosensory trigeminal stimulation. *Chem Senses* 32:343-353.

Bradbury JW, Vehrencamp SL (1998) Principles of animal communication. Sinauer.

Brandt G (2006) Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci Biobehav Rev* 30:908-917.

Brown RE, Macdonald DW (1985). *Social Odours in Mammals*. Oxford, Clarendon Press.

Burwash MD, Tobin ME, Woolhouse AD, Sullivan TP (1998 a) Laboratory evaluation of predator odors for eliciting an avoidance response in roof rats (*Rattus rattus*). *J Chem Ecol* 24:49-66.

Burwash MD, Tobin ME, Woolhouse AD, Sullivan TP (1998 b) Field testing synthetic predator odors for roof rats (*Rattus rattus*) in Hawaiian Macadamia nut orchards. *J Chem Ecol* 24:603-630.

Calder CJ, Gorman ML (1991) The effects of red fox *Vulpes vulpes* faecal odours on the feeding behaviour of Orkney voles *Microtus arvalis*. *J Zool Lond* 224:599-606.

Caro T (2005) *Antipredator defenses in birds and mammals*. Chicago, The University of Chicago Press.

Cometto-Muñiz JE, Cain WS, Hudnell HK (1997) Agonistic effects of airborne chemicals in mixtures: odor, nasal pungency, and eye irritation. *Percept psychophys* 59:665-674.

Cometto-Muñiz *et al.* (2005) Determinants for nasal trigeminal detection of volatile organic compounds. *Chem Senses* 30:627-642.

Cowan WM, Raisman G, Powell TP (1965) The connections of the amygdala. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 28:137-151.

Cox JG, Lima SL (2006) Naiveté and aquatic-terrestrial dichotomy in the effects of introduced predators. *Trends Ecol Evol* 21:674-680.

Dielenberg RA, McGregor IS (2001) Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Behav Rev* 25:597-609.

Delibes-Mateos M, Delibes M, Ferreras P, Villafuerte R (2008) Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conserv Biol* 22:1106-1117.

Dickman CR, Doncaster CP (1984) Responses of small mammals to red fox (*Vulpes vulpes*) odour. *J Zool* 204:521-531.

De Olmos J, Hardy H, Heimer L (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP study. *J Comp Neurol* 181:213-244.

Distel H y Hudson R (1985) The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *J Comp Physiol* 157: 599-605.

Doty RL, Brugger WE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ, Lowry LD (1978) Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol Behav* 20:175-185.

Eisenberg (1983) *The Social Organisation of Mammals*. Walter de Gruyter & CO. Vol 10. Pag. 1-25.

Endler JA (1991) Interaction between predators and prey. En Krebs JR, Davies NB (Eds.) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*, 3rd Ed. Pp 169-196, Oxford, Blackwell Science.

Endres T, Apfelbach R, Fendt M (2005) Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. *Behav Neurosci* 119:1004–1010.

Farbman AI (1992) *Cell biology of olfaction*. Cambridge University Press, Cambridge.

Fendt M (2006) Exposure to urine of canids and felids, but not of herbivores, induces defensive behavior in laboratory rats. *J Chem Ecol* 32:2617-2627.

Fendt M, Endres T, Apfelbach R (2003) Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *J Neurosci* 23:23-28.

Fendt M, Endres T (2008) 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – Just repugnant or really fear-inducing? *Neurosci Biobehav Rev* 32:1259–1266.

Ferrero DM, Lemon JK, Fluegge D, Pashkovski SL, Korzan WJ, Datta SR, Spehr M, Fendt M, Liberles SD (2011) Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *PNAS* 108:11235-11240.

Finger TE, Gatchell ML, Gatchell TV, Kinnamon JC (1990) Afferent and efferent functions of peptidergic innervation of the nasal cavity. En Green BG, Mason JR, Kare MR (eds) *Chemical Senses: Irritation*. Marcel Dekker, New York. Pp 1-20.

Flier J, Edwards MW, Daly JW, Myers CW (1980) Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na⁺–K⁺–ATPase. *Science* 208:503-505.

Frasnelli J, Hummel T (2007) Intranasal trigeminal function in subjects with and without an intact sense of smell. *Brain Res* 1139:235-244.

Glen A, Dicman R, Soulé M, Macky BG (2007) Evaluating the role of the dingo as a trophic regulator in Australian ecosystems. *Austral Ecol* 32:492-501.

Hacquemand R, Pourie G, Jacquot L, Brand G (2010 a) Postnatal exposure to synthetic predator odor (TMT) induces quantitative modification in fear-related behaviors during adulthood without change in corticosterone levels. *Behav Brain Res* 215:58-62.

Hacquemand R, Jacquot L, Brand G (2010 b) Comparative fear-related behaviors to predator odors (TMT and natural fox feces) before and after intranasal ZnSO₄ treatment in mice. *Front Behav Neurosci* 4:188.

Halpern M (1987) The organization and function of the vomeronasal system. *Ann Rev Neurosci* 10:325-362.

Hari R, Portin K, Kettenmann B, Jousmäki V, Kobal G (1997) Right-hemisphere preponderance of responses to painful CO₂ stimulation of the human nasal mucosa. *Pain* 72:145-151.

Hayes RA, Nahrung HF, Wilson JC (2006) The response of native Australian rodents to predator odours varies seasonally: a by-product of life history variation? *Anim Behav* 71:1307-1314.

Heimer L (1972) The olfactory connections of the diencephalon in the rat. *Brain Behav Evol* 6:484-523.

Hudson R y Distel H (1983) Nipple location by newborn rabbits: behavioural evidence for pheromonal guidance. *Behav* 85: 260-275.

Hummel T, Pauli E, Stefan H, Kettenmann B, Schüler P, Kobal G (1995) Chemosensory event-related potentials in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 36:79-85.

Hummel T, Yousem DM, Alsop DC, Geckle RJ, Doty RL (1997) Functional MRI of olfactory and intranasal chemosensory trigeminal nerve activation. *Soc Neurosci Abstr* 23:2076.

Hummel T, Livermore A (2002) Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *Int Arch Occup Environ Health* 75:305-313.

Hummel T, Futschik T, Frasnelli J, Hüttenbrink KB (2003) Effects of olfactory function, age, and gender on trigeminally mediated sensations: a study based on the lateralization of chemosensory stimuli. *Toxicol Lett* 140-141:273-280.

Hummel T, Doty RL, Yousem DM (2005) Functional MRI of intranasal chemosensory trigeminal activation. *Chem Senses* 30:205-206.

Hummel T, Iannilli E, Frasnelli J, Boyle J, Gerber J (2009 a) Central processing of trigeminal activation in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1170:190-195.

Hummel T, Oehme L, van der Hoff J, Gerber J, Heinke M, Boyle JA, Beuthien-Baumann B (2009 b) PET-based investigation of cerebral activation following intranasal trigeminal stimulation. *Hum Brain Mapp* 30:1100-1104.

Huttunen J, Kobal G, Kaukoronta E, Hari R (1986) Cortical responses to painful CO₂ stimulation of nasal mucosa: a magnetoencephalographic study in man. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 64:347-349.

Iannilli E, Del Gratta C, Gerber JC, Romani GL, Hummel T (2008) Trigeminal activation using chemical, electrical, and mechanical stimuli. *Pain* 139:376-388.

Inokuchi A, Kimmelman CP, Snow JB (1993) Convergence of olfactory and nasotrigeminal inputs on possible trigeminal contributions to olfactory responses in rat thalamus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 249:473-477.

Jaksic FM, Soriguer RC (1981) Predation upon the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Mediterranean habitats of Chile and Spain: a comparative analysis. *J Anim Ecol* 50:269-281.

Jones-Gotman M, Zatorre RJ (1993) Odor recognition memory in humans: role of right temporal and orbitofrontal regions. *Brain Cogn* 22:182-198.

Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecosci* 5:361-394.

Kettenmann B, Hummel C, Stefan H, Kobal G (1996) Magnetoencephalographical recordings: separation of cortical responses to different chemical stimulation in man. *Funct Neurosci EEG Suppl* 46:287-290.

Kevetter GA, Winans SS (1981) Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. II. Efferents olfactory amygdala. *J Comp Neurol* 197:99-111.

Komai M, Bryant BP (1993) Acetazolamide specifically inhibits lingual trigeminal nerve responses to carbon dioxide. *Brain Res* 612:122-129.

Kratskin I, Hummel T, Hastings L, Doty R (2000) 3-Methylindole alters both olfactory and trigeminal nasal musosal potentials in rats. *Neuroreport* 11:2195-2197.

Krettek JE, Price JL (1978 a) Amygdaloid projections to subcortical structures within the forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178:225-254.

Krettek JE, Price JL (1978 b) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid connections. *J Comp Neurol* 178:255-280.

Kristen J y Caitlin R. (2008) Innate and Learned Predator Recognition Mediated by Chemical Signals in *Eurycea nana*. *Ethology* 114:607-615.

Kusch RC, Mirza RS, Chivers DP (2004) Making sense of predator scents: Investigating the sophistication of predator assessment abilities of fathead minnows. *Behav Ecol Sociobiol* 55:551-555.

Lang J (1989) Clinical anatomy of the nose, nasal cavity and paranasal sinuses. Thieme Medical Publishers Inc., New York.

Laska M, Distel H, Hudson R (1997) Trigeminal Perception of Odorant Quality in Congenitally Anosmic Subjects. *Chem Senses* 22:447-456.

Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can J Zool* 68:619-640.

Mackenzie RA, Burke D, Skuse NF, Lethlean AK (1975) Fiber function and perception during cutaneous nerve block. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38:865-873.

Meredith M y O'Connell RJ (1988) HRP uptake by olfactory and vomeronasal receptor neurons: use as an indicator of incomplete lesions and relevance for non-volatile chemoreception. *Chem Senses* 13:487-515.

Monclús R (2007) El efecto de los depredadores en el comportamiento y en la respuesta fisiológica de estrés en el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis Doctoral.

Monclús R, Rödel HG, von Holst D, De Miguel J (2005) Behavioural and physiological responses of naïve European rabbits to predator odour. *Anim Behav* 70:753-761.

Mora-Novaro OA, Sánchez-Criado JE (1992) Fisiología del olfato. En Tresguerres JAF (Ed) Fisiología humana. Interamericana, Madrid. Pp 328-340.

Mykytowycz R (1970) The role of skin glands in mammalian communication. En Johnson JW, Moulton DG, Turk A (Eds) Advances in chemoreception. I. Communication by chemical senses. Appleton-Century-Crofts, New York. Pp 327-360.

Nicolás L, Martínez-Gómez M, Hudson R, Bautista A (2011) Littermate presence enhances motor development, weight gain and competitive ability in newborn and juvenile domestic rabbits. *Develop Psychobiol* 53:37-46.

- Nolte DL, Mason JR, Epple G, Aronov E, Campbell DL (1994) Why are predator urines aversive to prey? *J Chem Ecol* 20:1505-1516.
- Olsson MJ, Cain WS (1996) Lateralization of odor recognition. *Chem Senses* 21:650.
- Papes F, Logan DW, Stowers L (2010) The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141:692-703.
- Paxinos G (1995) *The Rat Nervous System*. Academic Press, 2nd. Ed, San Diego.
- Powell TPS, Cowan WM, Raisman G (1965) The central olfactory connections. *J Anat* 99:791-813.
- Pongrácz P, Altbäcker V (2000) Ontogeny of the responses of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to aerial and ground predators. *Can J Zool* 78:655-665.
- Punzo F (2005) Chemosensory recognition by males of the Desert Pocket Mouse, *Chaetodipus pencillatus* to odors of various species of snakes. *Ethol Ecol Evol* 17:83-89.
- Rosell F, Sanda JI (2006) Potential risk of olfactory signaling: the effect of predators on scent marking by beavers. *Behav Ecol* 17:897-904.
- Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161:31-56.
- Scalia F, Winans SS (1976) New perspectives on the morphology of the olfactory system: the olfactory and the vomeronasal pathways in mammals. En Doty RL (Ed) *Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior*. Academic Press, New York. Pp 7-28.
- Scott JW, Leonard CH (1971) The olfactory connections of the lateral hypothalamus in the rat, mouse and hamster. *J Comp Neurol* 141:331-344.
- Sekizawa SI, Tsubone H (1994) Nasal receptors responding to noxious chemical irritants. *Respiration Physiol* 96:37-48.
- Shiple MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12:669-688.
- Shiple MT, McLean JH, Ennis M (1995) Olfactory system. En Paxinos G (Ed) *The rat nervous system*. Academic Press. Pp 899-921.
- Smith RJF (1992) Alarm signals in fishes. *Rev Fish Biol* 2:33-63.

- Snow PJ, Lumb BM, Cervero F (1992) The representation of prolonged and intense, noxious somatic and visceral stimuli in the ventrolateral orbital cortex of the cat. *Pain* 48:89-99.
- Steen KH, Wegner H, Kreysel HW, Reeh PW (1995) The pH-release of rat cutaneous nociceptors correlates with extracellular $[Na^+]$ and is increased under amiloride, in vitro. *Soc Neurosci* 21:648.
- Stoddart (1982) Does trap odour influence estimation of population size of the short-tailed vole, *Microtus agrestis*? *J Anim Ecol* 51:375-386.
- Stone H (1969) Effect of ethmoidal nerve stimulation on olfactory bulbar electrical activity. En Pfaffmann C (ed) *Olfaction and Taste*. Rockefeller University Press, New York. Pp 216-220.
- Stone H, Rebert CS (1970) Observations of trigeminal olfactory interactions. *Brain Res* 21:138-142.
- Sullivan TP, Crump DR, Sullivan DS (1988) Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores. III. Montane and meadow voles (*Microtus montanus* and *Microtus pennsylvanicus*). *J Chem Ecol* 14:363-377.
- Sündermann D, Scheumann M, Zimmermann E (2008) Olfactory predator recognition in predator-naïve gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *J Comp Psychol* 122:146-155.
- Takahashi LK, Nakashima BR, Hong J, Watanabe K (2005) The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1157-1167.
- Taniguchi K, Mikami S (1985) Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of the horse and cattle. *Cell Tissue Res* 240:41-48.
- Vernet-Maury E (1980) Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat. En van der Starre H (ed) *Proceedings of the VII International Symposium on Olfaction and Taste VII*. London, IRL Press. P 407.
- Viitala J, Korpimäki E, Palokangas P, Koivula M (1995) Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet light. *Nature* 373:425-427.
- Wallace KJ, Rosen JB (2000) Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav Neurosci* 114:912-922.
- Wang RT, Halpern M (1982a) Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes. 1. Degeneration of bipolar neurons and proliferation of undifferentiated cells following experimental vomeronasal axotomy. *Brain Res* 237: 23-39.

Wang RT, Halpern M (1982b) Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes. 2. Reconstitution of the bipolar neuron layer following experimental vomeronasal axotomy. *Brain Res* 237: 41-59.

Wisenden D, Chivers P (2006) The role of public chemical information in antipredator behaviour. En Ladich F, Collins SP, Moller P, Kapoor BG (Eds) *Fish Communication*. Science Publisher, NH. Pp 259-278.

Wisenden BD, Stacey NE (2005) Fish semiochemicals and the network concept. En McGregor PK (Ed) *Animal Communication Networks*. Cambridge University Press.

Wysocki CJ (1979) Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev* 3: 301-341.

Wysocki CJ, Meredith M (1987) The vomeronasal system. En: Finger TE, Silver WM (eds) *Neurobiology of taste and smell*. Wiley, New York, pp 125-150.

Yousem DM, Maldjian JA, Siddigi F, Hummel T, Alsop DC, Geckle RJ, Bilker WB, Doty RL (1999) Gender effects on odor-stimulated functional magnetic resonance imaging. *Brain Res* 818:480-487.

Zatorre RJ, Jones-Gotman M, Evans AC, Meyer E (1992) Functional localization and lateralization of human olfactory cortex. *Nature* 360:339-340.

Zhang JX, Cao C, Gao H, Yang ZS, Sun L, Zhang ZB, Wang ZW (2003) Effects of weasel odor on behavior and physiology of two hamster species. *Physiol Behav* 79:549-552.

Zhang JX, Sun L, Novotny M (2007) Mice respond differently to urine and its major volatile constituents from male and female ferrets. *J Chem Ecol* 33:603-612.