

EFFECTOS DE LA CIRUGIA CEREBRAL, LA EXPERIENCIA SEXUAL Y LA EDAD EN LA DISCRIMINACIÓN OLFATORIA DE OLORES SEXUALMENTE RELEVANTES EN RATAS MACHO

Sandoval Cárdenas D.I, Mac Gregor Regalado J.P.
Instituto de Neurobiología Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro.

RESUMEN

Los olores volátiles de la orina de congéneres contribuyen al reconocimiento de la pareja sexual en varios mamíferos como las ratas. Usamos pruebas de habituación/discriminación para determinar los efectos de la cirugía cerebral sobre la discriminación olfatoria de estímulos sexualmente relevantes en diez machos jóvenes expertos Wistar; así como para determinar las diferencias en discriminación olfatoria entre machos inexpertos jóvenes e inexpertos viejos y entre machos jóvenes expertos e inexpertos. Veinte machos Wistar se sometieron a tres pruebas de discriminación olfatoria con los estímulos *macho-estro*, *estro-anestro* y *menta-plátano*. Los diez machos expertos se sometieron a cirugía estereotáxica (lesionando a cinco con solución salina y a otros cinco con ácido quinolínico) y posteriormente a las mismas tres pruebas de discriminación olfatoria.

Hicimos las pruebas de discriminación y observamos que las lesiones *sham* no tuvieron un efecto evidente en las pruebas de discriminación olfatoria, mientras que las *no lesiones* realizadas con ácido quinolínico disminuyeron los tiempos de olfacción, en las mismas pruebas, sin modificar la preferencia por los estímulos. Los *jóvenes inexpertos* presentaron menores tiempos de olfacción que los *viejos inexpertos* y, a diferencia de éstos, no prefirieron *estro* sobre *anestro*. Los *inexpertos* no presentaron preferencia por ninguno de los estímulos sexualmente relevantes, mientras que los *expertos* prefirieron a *macho* sobre *estro*.

INTRODUCCIÓN

El olfato nos permite obtener información del ambiente, mediante el procesamiento de las moléculas que en él se encuentran, brindándonos señales de peligro, placer, comida, la presencia de algo que evadir o buscar, así como el reconocimiento de una pareja sexual potencial, en cuyo caso los olores corporales volátiles contribuyen a su reconocimiento, en mamíferos. Éstos utilizan la orina como la mayor fuente de secreción de sustancias químicas para el inicio de conductas mediadas por feromonas (sustancia química que lleva información sobre el estado fisiológico o conductual del individuo a un congénere, resultando en una reacción específica y preprogramada del receptor) [Shipley, 2004]. A pesar de que se sabe que las señales olfatorias juegan un papel decisivo en el control de la conducta y en algunos procesos de memoria, los mecanismos neurales involucrados en la percepción de los olores todavía no están bien comprendidos. El sistema olfatorio accesorio (SOA) o sistema de proyección vomeronasal, es el principal mediador de feromonas que desencadenan cambios fisiológicos y hormonales preprogramados y estereotipados, mismos que están mediados por proyecciones de este sistema a zonas límbicas como la amígdala medial y posteromedial, el núcleo del lecho de la estría Terminal y el área preóptica medial/hipotálamo anterior (APM/HA). Ésta es necesaria para el inicio y mantenimiento de la conducta sexual masculina, por lo que su lesión bilateral impide el inicio de la cópula en ratas macho. Se han propuesto tres hipótesis para explicar la función del APM/HA en ratas machos: que las neuronas de ésta modulan los aspectos consumatorios del comportamiento sexual, que modula la motivación sexual y que está involucrada en ambos aspectos. El comportamiento sexual opera bajo dos mecanismos: el motivacional (se refiere a una fuerza que impulsa al individuo a realizar una conducta tomando en cuenta factores internos y

externos con el fin de alcanzar una meta), que lleva al individuo a la búsqueda e inicio de la interacción con la pareja sexual, y el consumatorio, que permite llevar a cabo la cópula.

En las pruebas de discriminación olfatoria, los individuos experimentan una *habituación* o pérdida temporal de la sensibilidad como resultado de una estimulación continua. De acuerdo a Cain (1978) la sensibilidad nunca se elimina por completo; sin embargo, la magnitud percibida disminuye aproximadamente un 2.5% cada segundo hasta alcanzar una reducción del 70%. Los olores novedosos provocan que los individuos investiguen el nuevo estímulo rompiendo el patrón de habituación hacia el estímulo anterior. En este principio se basa nuestro experimento.

OBJETIVO

Determinar los efectos de: la cirugía cerebral en la discriminación de estímulos sexualmente relevantes y las diferencias en discriminación olfatoria entre machos inexpertos jóvenes y viejos.

HIPÓTESIS

1. Las lesiones falsas producidas con solución salina no afectan la capacidad de discriminación de olores en ratas macho.
2. Las lesiones producidas con ácido quinolínico fuera del área preóptica media/hipotálamo anterior (APM/HA) no afectan la capacidad de discriminación de olores en ratas macho.
3. Los patrones de discriminación olfatoria no se ven alterados por la edad en ratas macho.
4. Existen diferencias significativas entre los patrones de discriminación olfatoria de ratas macho expertos e inexpertos.

METODOLOGÍA

Quince machos Wistar de entre 297g y 380g de peso se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 5 individuos: *jóvenes inexpertos*, *jóvenes expertos sham* y *jóvenes expertos quinolínico*. A los *jóvenes inexpertos* se les sometió a tres pruebas de discriminación olfatoria (*macho-estro*, *estro-anestro* y *menta-plátano*). A los *jóvenes expertos sham* se les sometió, en orden consecutivo, a tres pruebas de conducta sexual, tres pruebas de discriminación olfatoria, cirugía estereotáxica (inyectando solución salina) y tres pruebas de discriminación olfatoria. A los *jóvenes expertos quinolínico* se les sometió a tres pruebas de de conducta sexual, tres pruebas de discriminación olfatoria, cirugía estereotáxica (inyectando ácido quinolínico: antagonista de los receptores NMDA que induce a apoptosis a las neuronas excitadoras del circuito) y finalmente a tres pruebas de discriminación olfatoria. El grupo de *viejos inexpertos* se formó con cinco machos Wistar de entre 495g y 643g de peso, a los que se sometió a tres pruebas de discriminación olfatoria. Si los datos presentaban una distribución normal, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas y si hubo diferencias en alguno de los factores se realizó una prueba de t-protégida LSD de Fisher como posthoc.

A continuación se describen las pruebas utilizadas.

Conducta sexual

Para la cópula, las ratas se colocaron en cajas de plástico o madera con aserrín que permitieran la observación de éstas en su interior. En cada caja se colocó un macho con una hembra ovariectomizada receptiva (mediante la inyección de 0.2ml de estradiol 48 horas antes y 0.2ml de progesterona 4 horas antes de la observación) durante un periodo de 1 hora como máximo. Durante cada prueba se observó la conducta sexual del macho registrándose el tiempo de la primera monta y de la primera intromisión, mismas que fueron contabilizadas hasta la eyaculación, de la cual también se registró el tiempo. A los grupos correspondientes: *jóvenes expertos sham* y *jóvenes expertos quinolínico* se les sometió a ésta prueba tres veces (con 48h de

intervalo entre cada prueba) con el fin de lograr un comportamiento de experiencia sexual (que difiere de la inexperiencia presentando una reducción en el tiempo de cópula).

Discriminación olfatoria

La orina se recolectó sobre una plancha metálica limpia, en la que se colocó a las ratas sujetándolas por la base de la cola y levantándolas inmediatamente después de que orinaran, para evitar el contacto de la orina con sus patas o cola. Se succionó la orina con una jeringa y se depositó en un frasco hasta coleccionar aproximadamente 3ml de orina. Esto se realizó, por separado, con hembras en estro, hembras en anestro y machos expertos para obtener los estímulos de *estro*, *anestro* y *macho*. Cada estímulo se homogeneizó con el vortex y se formaron alícuotas de 100µl que se almacenaron a -12°C. Antes de cada prueba se descongelaban las alícuotas necesarias. Para el estímulo de menta se utilizó extracto de menta marca “Just” diluida en glicerol 1 a 10 v/v en glicerol y para el estímulo de plátano se utilizó acetato de amilo en glicerol 1 a 10 v/v. Cada macho se sometió a tres pruebas de discriminación olfatoria: *macho-estro*, *estro-anestro* y *menta-plátano*; en días consecutivos y a partir de las 10:00am. Para realizar las pruebas se elaboraron cajas con tapas especiales, recubiertas por una malla metálica que permitiera el paso del olor pero no el contacto físico directo del macho con el estímulo y que mantuviera los platos para pesar en un lugar fijo. Los estímulos se presentaron pipeteando 10µl del estímulo en un filtro Whatman de 21mm de diámetro pegado con maskin tape a un plato para pesar en balanza nuevo (“plastic weigh boats”) de 4.5x4.5cm. A cada estímulo se le asignó un plato específico y un papel filtro nuevo por presentación. Cada prueba consistió en 2 presentaciones consecutivas de agua destilada, seguidas por 3 presentaciones consecutivas del primer estímulo y 3 presentaciones consecutivas del segundo estímulo, invirtiendo el orden de los estímulos para el siguiente macho evaluado. Antes de cada prueba se otorgaron 5 min para la habituación del individuo a las condiciones de la prueba. Cada estímulo se presentó durante 2 min con un minuto de intervalo entre estímulos sucesivos. Se registró el número de segundos, durante la presentación de 2 min del estímulo, que un macho colocó su nariz contra la malla metálica dentro del área abarcada por el plato. Se utilizaron análisis de varianza y pruebas posthoc de Fisher (LSD) para comparar los tiempos de olfacción.

Cirugía estereotáxica

Los machos correspondientes se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital, ajustando la dosis de acuerdo al peso de cada rata, utilizando una relación de 0.7ml/kg y adicionando 0.01ml al final. Los machos se montaron en un aparato estereotáxico sobre el cual se localizaron las coordenadas de bregma con la ayuda de un vernier y de una aguja Hamilton (montada al estereotáxico). Se trepanó el cráneo y se realizaron lesiones bilaterales a una distancia, a partir de bregma, medio-lateral de ± 0.06 mm y una profundidad, a partir de la dura madre, de 8mm. En cada lesión unilateral se inyectaron 0.5µl de solución: salina-para el grupo *jóvenes expertos sham*- o ácido quinolínico -para el grupo de *jóvenes expertos quinolínico* éste grupo no se pudo lesionar dentro del APM/HA-. La solución se inyectó lentamente, otorgándose 5 min para su difusión.

RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos en las pruebas de discriminación olfatoria donde se refiere como *macho* a la orina de machos expertos sexualmente activos, *estro* a la orina de hembras en estro, *anestro* a la orina de hembras en anestro y *plátano* al estímulo formado por la dilución de acetato de amilo. Las gráficas se muestran en el Anexo.

Cirugía

Sham: Los grupos logran discriminar (excepto por la presentación consecutiva de *anesto-estro*); sin embargo ningún grupo evidencia preferencia por algún estímulo. El grupo *antes* huele más significativamente el *estro* que el *anestro* y la *menta* sobre el olor de *plátano*.

Quinolínico: Hay una discriminación ante los estímulos, a excepción de la prueba *estro-anestro*. Ambos grupos muestran una preferencia por *macho* sobre *estro*. El grupo *antes* huele durante más tiempo a: *estro* que a *anestro* y a los estímulos *plátano* y *menta* sobre el grupo *después*.

Edad: Los jóvenes tienen poca capacidad de discriminación entre los estímulos presentados. En general los *viejos* si discriminan entre estímulos y, a diferencia de los *jóvenes*, prefieren a *estro* que a *anestro*. Los *viejos* huelen durante más tiempo a *estro* que a *macho*, y a *estro* que a *anestro*.

Experiencia: No hay una buena capacidad de discriminación entre los estímulos *estro-anestro*. Los *expertos* muestran preferencias por *macho* sobre *estro*. Los *expertos* presentan mayores tiempos de olfacción para *macho* y *menta* con respecto a los *inexpertos*.

CONCLUSIONES

Con el presente estudio se demostró que las “falsas lesiones o sham” realizadas con solución salina en el área APM/HA (mediante cirugía estereotáxica) no tienen un efecto evidente en machos expertos durante las pruebas de discriminación olfatoria. Las “lesiones fuera” realizadas con ácido quinolínico fuera del APM/HA reducen el tiempo de olfacción durante las pruebas de discriminación olfatoria *estro-anestro* y *menta-plátano*, pero no modifican la preferencia por los estímulos.

Contrario a lo que se pensaba los *jóvenes* presentan menores tiempos de olfacción ante los estímulos que los *viejos*, mismos que sí presentan una preferencia por los estímulos *estro* en las pruebas *estro-anestro*, aunque no es así en la prueba *macho-estro*.

De acuerdo a la bibliografía, se encontró que los jóvenes *inexpertos* no muestran preferencias por ninguno de los estímulos sexualmente relevantes: *macho*, *estro* y *anestro*. Sin embargo se encontró que los jóvenes *expertos* tenían una preferencia de *macho* sobre *estro*. Ésta diferencia se puede deber a que algunos machos olían muy poco los estímulos que se les presentaban en las pruebas de discriminación olfatoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baum MJ and Keverne EB. 2002. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Hormones and Behavior*. 41, 213-219.
- Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M., “Principles of neural science”, Appleton & Lange, Connecticut, **1991**.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J.2006. Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem. Senses*. 31:753-762.
- Larsson, K. “Conditioning and sexual behavior in the male albino rat”. Almqvist & Wiksells, Stockholm, **1956**.
- LeMagnen, J. 1999. Les phenomenes olfacto-sexuels chez le rat blanc. *Arch. Sci. Physiol*. 6, 295-332.
- Mac Gregor, J.P. “Papel del área preóptica medial en la percepción y discriminación de estímulos olfatorios sexualmente relevantes en la rata macho”. Tesis de Maestría en Ciencias: Neurobiología, Instituto de Neurobiología Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro, México, **2007**.
- Matlin, M.W., “Sensation and Perception”, Allyn and Bacon. Massachusetts, **1988**.
- Paxinos, G; Watson, C. “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”. Academic Press Inc. San Diego. **1986**.

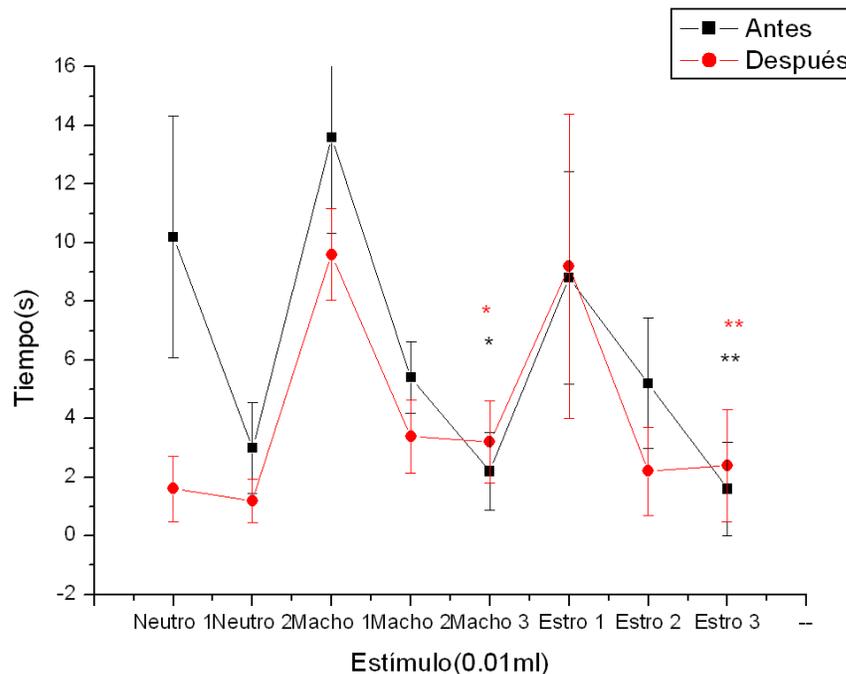
ANEXO

A continuación se presentan las gráficas detalladas de cada prueba de olfacción para los diferentes experimentos. En éstas gráficas se indican con asteriscos, del mismo color que la curva a la que se refieren: las diferencias significativas entre la tercera presentación del primer estímulo (sobre el que se observan el/los asteriscos) y la primera presentación del segundo estímulo; y las diferencias significativas entre la tercera presentación del segundo estímulo (sobre el que se observan el/los asteriscos) y la primera presentación del primer estímulo. Las cruces (+) de color negro o rojo, hacen referencia a la curva de éste color; de ellas se puede interpretar que el grupo analizado, prefiere, significativamente, el estímulo sobre el que se encuentra la cruz, con respecto al otro estímulo. Por último las cruces azules (+) indican una preferencia de el estímulo sobre el cual se encuentran de un grupo con respecto al otro; es fácil inferir a partir de la gráfica, que grupo es el que muestra mayores tiempos de olfacción ante el estímulo.

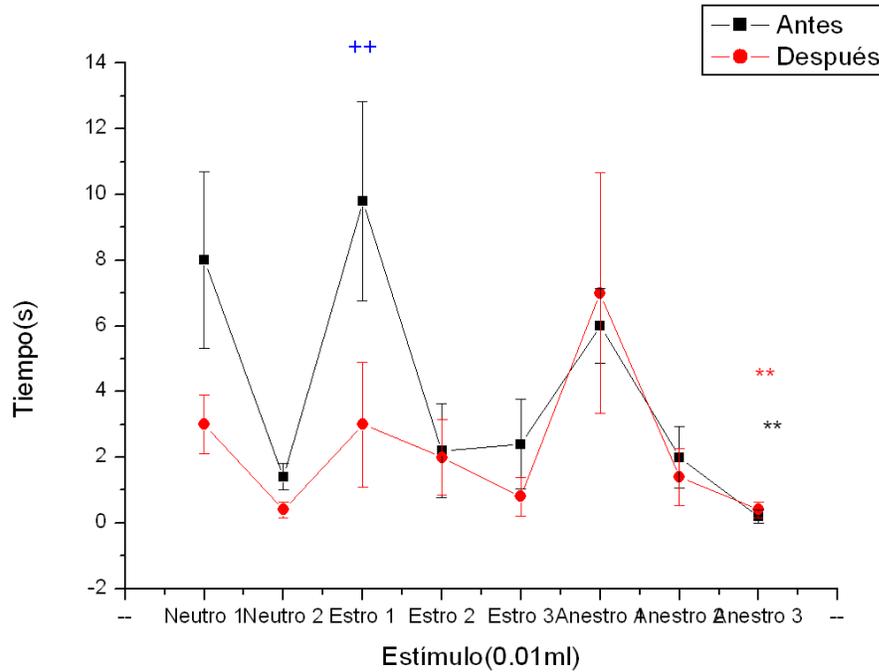
En todos los casos la presencia de un símbolo (asterisco o cruz) indica una diferencia significativa donde $p < 0.05$, mientras que la presencia de dos símbolos indica una diferencia significativa donde $p < 0.01$. Todos los datos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas y si hubo diferencias en alguno de los factores se realizó una prueba de t-protégida LSD de Fisher como posthoc.

EFFECTOS DE LA CIRUGÍA

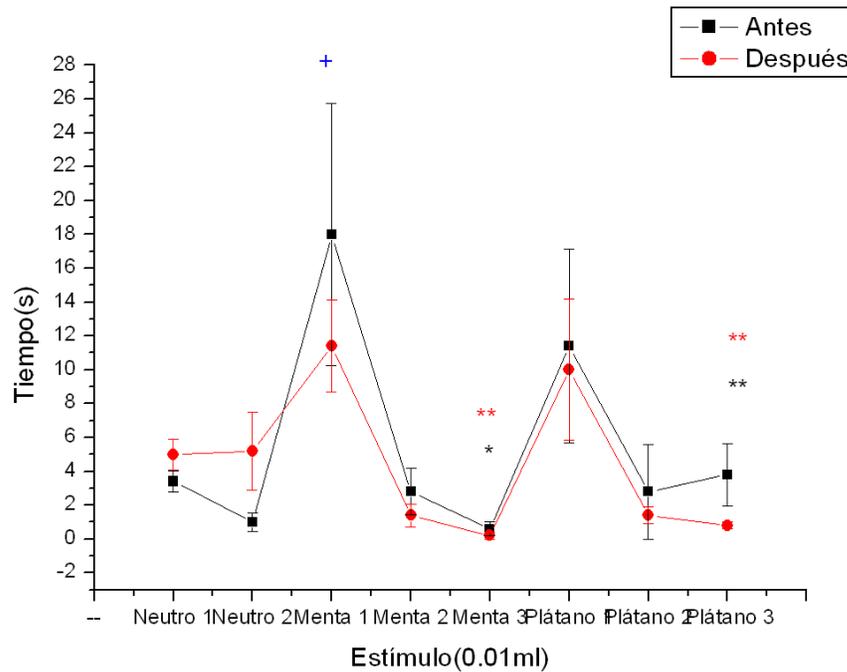
Sham



Gráfica 1. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0009$) –habitación ante el estímulo presentado-. Ambos grupos son capaces de discriminar entre los estímulos (*,*) y no presentan una preferencia significativa por alguno de ellos. No hay diferencia significativa entre grupos.

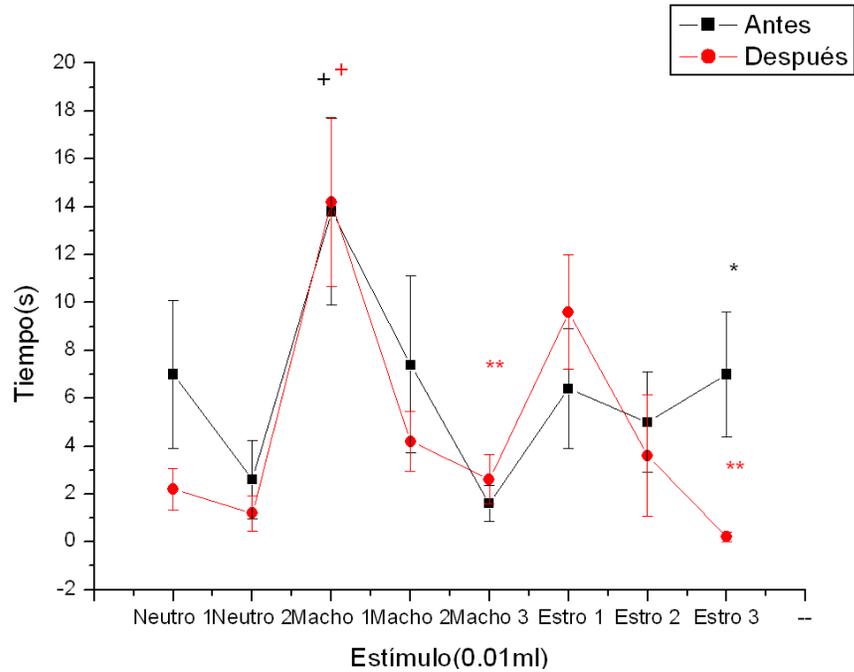


Gráfica 2. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p < 0.0001$) –habituaación ante el estímulo presentado–. Ambos grupos son capaces de discriminar entre *anestro* y *estro* (*,*), pero no a la inversa, y ninguno presenta una preferencia por cualquiera de éstos; sin embargo *antes* huelen durante más tiempo a *estro* que el grupo *después*.

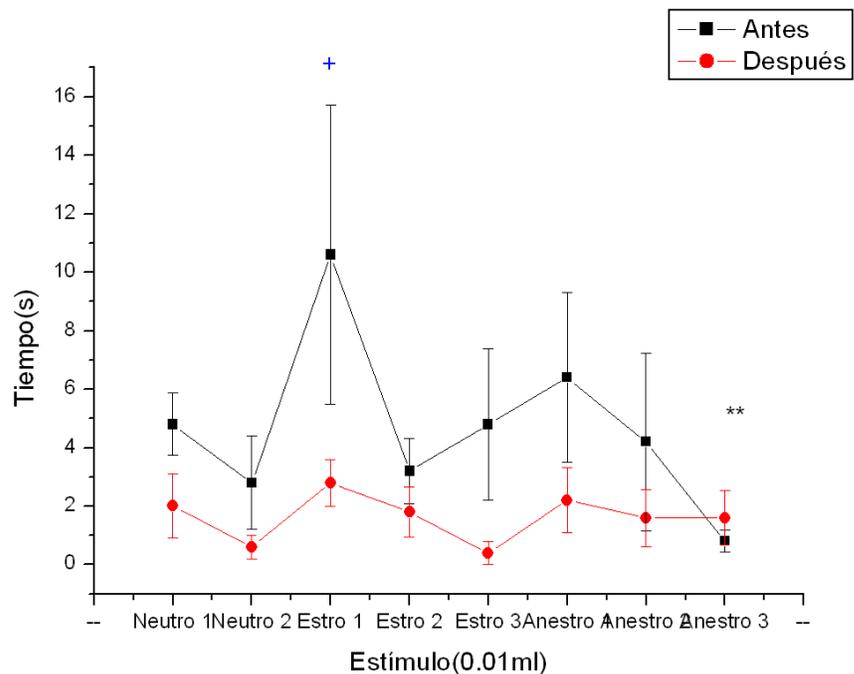


Gráfica 3. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p = 0.0016$) –habituaación ante el estímulo presentado–. Ambos grupos son capaces de discriminar entre los estímulos (*,*) y ninguno presenta una preferencia por cualquiera de éstos; sin embargo *antes* de la cirugía los machos huelen durante más tiempo el estímulo *menta* que *después* (+) de la cirugía.

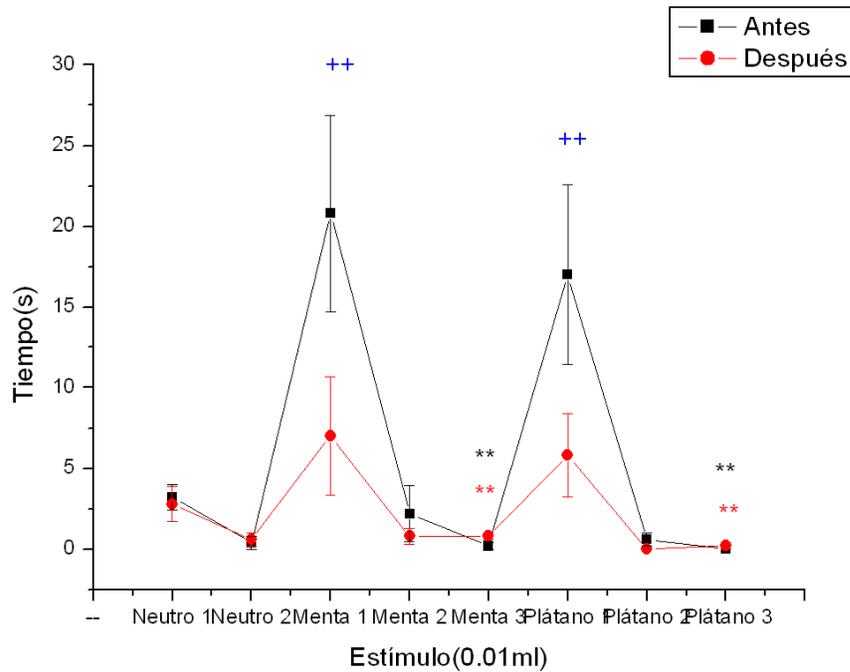
Quinolínico



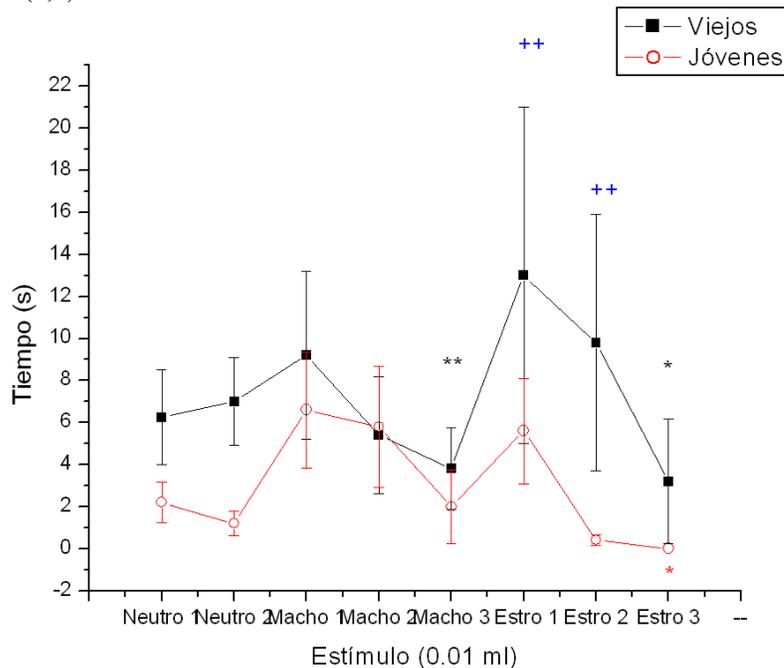
Gráfica 4. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0006$) –habitación ante el estímulo presentado-. El grupo *después* es capaz de discriminar entre los estímulos(*), mientras que el grupo *antes* sólo puede discriminar entre *estro* y *macho* (*). Ambos grupos muestran una preferencia por *macho*(+,+). No hay una diferencia significativa entre grupos.



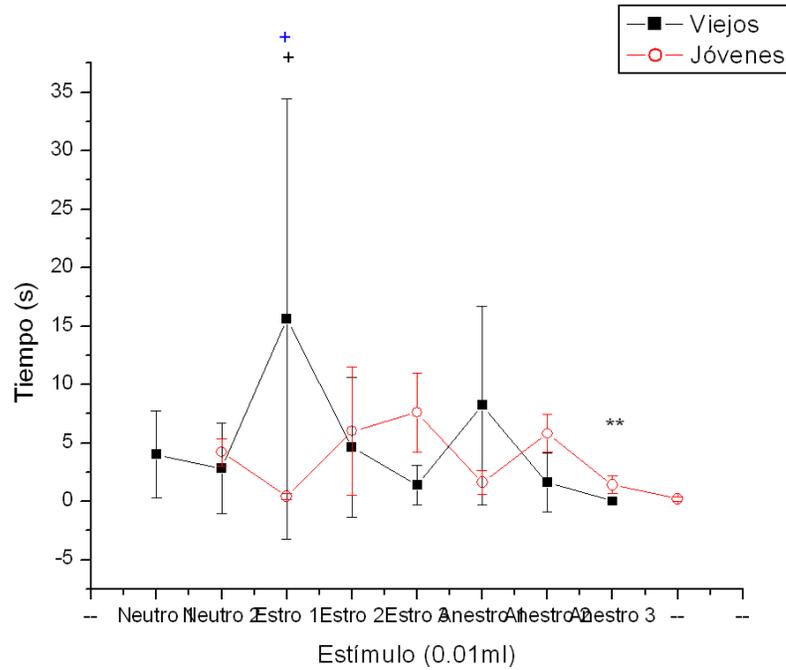
Gráfica 5. Hay diferencias significativas entre los grupos ($p=0.0111$), donde el grupo *antes* huelen durante más tiempo el estímulo *estro* (+) que *después* de la cirugía. Sólo el grupo *antes* puede discriminar entre *anestro-estro*(*).



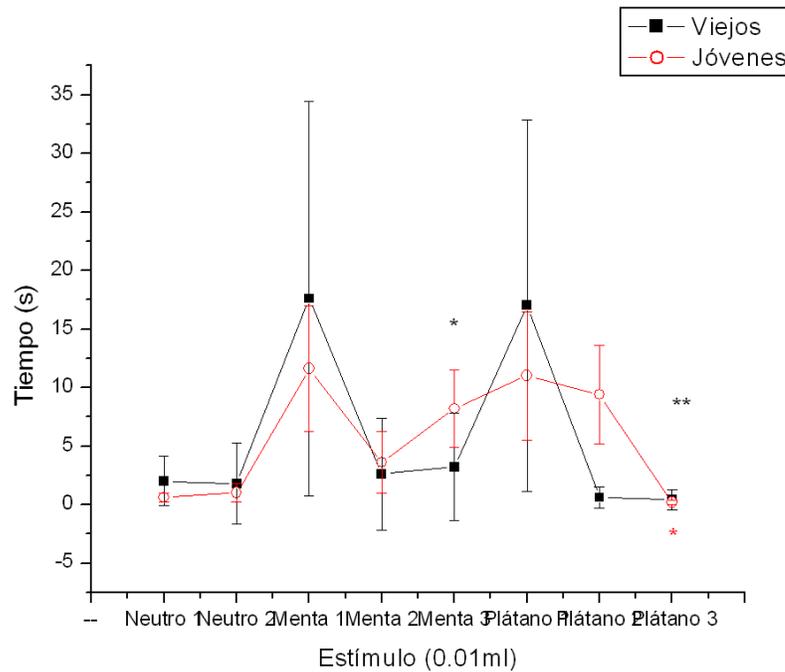
Gráfica 6. Hay diferencias significativas entre los grupos ($p=0.0429$) –con una mayor olfacción del grupo *antes* por ambos estímulos (+), con respecto al grupo *después*. También hay una diferencia significativa entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0002$) –habituaación ante el estímulo presentado-. Finalmente se observa capacidad de discriminación(*,*) entre los estímulos.



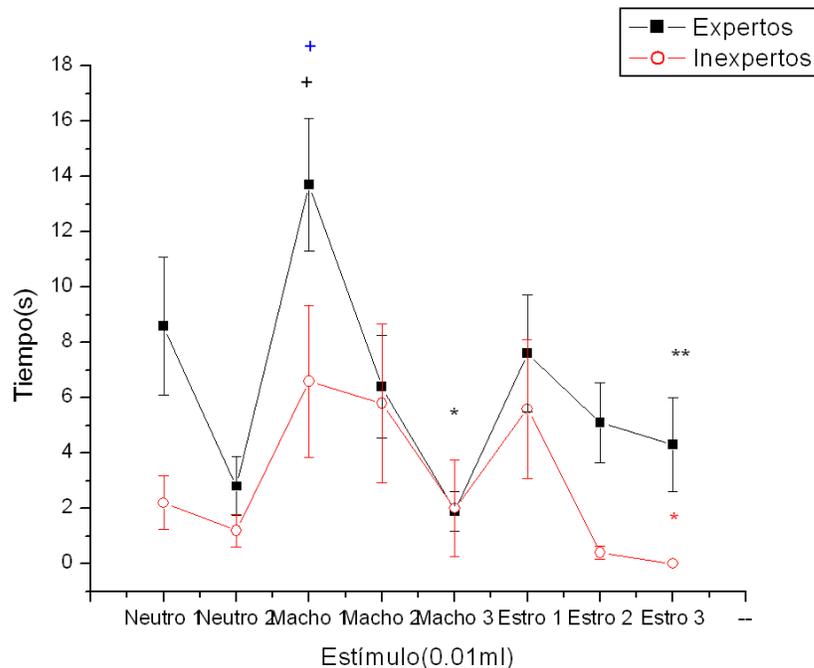
Gráfica 7. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.042$) –habituaación ante el estímulo presentado consecutivamente-. Los *jóvenes* son capaces de discriminar entre estímulos (*) y huelen durante más tiempo el estímulo *estro 1* y *2* (+) que los *viejos*. Los *jóvenes* sólo discriminan al presentar primero *estro* y después *anestro* (*).



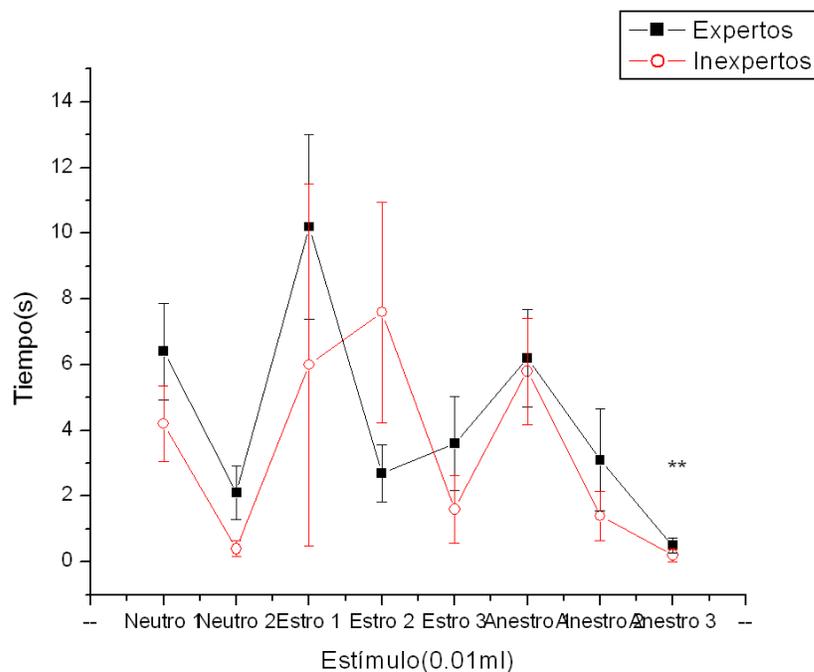
Gráfica 8. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0282$) –habitua- ción ante el estímulo presentado consecutivamente-. Sólo los *viejos* son capaces de discriminar al presentarse primero el estímulo de *anestro* y después el de *estro* (*); también prefieren a *estro* sobre *anestro* y huelen durante más tiempo el estímulo *estro* que los *jóvenes*.



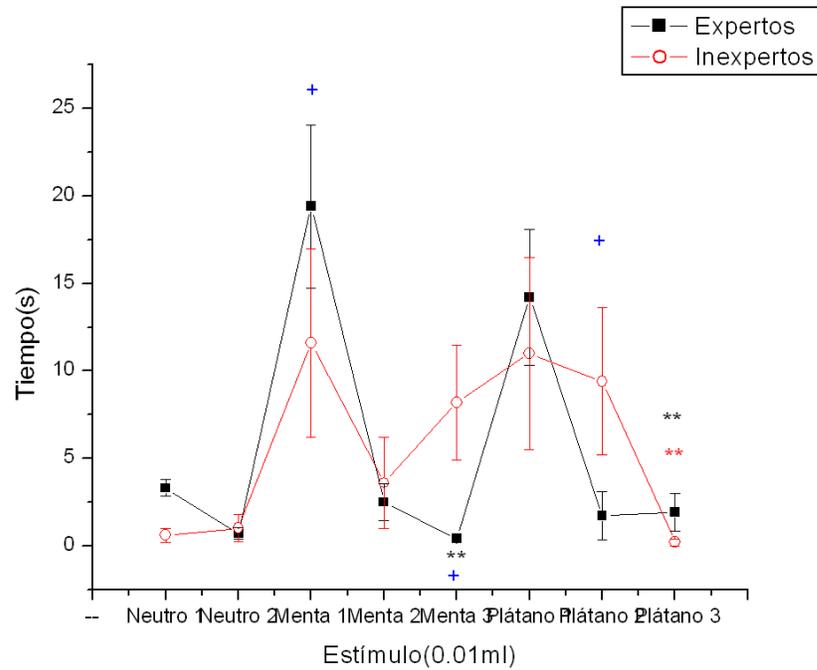
Gráfica 9. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0059$) –habitua- ción ante el estímulo presentado consecutivamente-. Los *viejos* son capaces de discriminar entre los estímulos (*) mientras que los *jóvenes* sólo discriminan en el orden *plátano-menta*. No hay diferencia significativa entre los grupos.



Gráfica 10. Hay diferencias significativas entre: los grupos ($p=0.0078$) –indicando preferencia por el estímulo *macho* de los machos *expertos*(+) sobre los *inexpertos*-, entre los estímulos ($p=0.0205$) -los machos *expertos* muestran una preferencia por el estímulo *macho* (+) sobre *estro*- y entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0003$) – lo que se interpreta como una habituación ante el estímulo presentado-. Los *expertos* son capaces de discriminar entre los estímulos *macho* y *estro* (*). Los *inexpertos* son capaces de discriminar entre *estro* -*macho* (*) pero la diferencia no es significativa cuando los estímulos se presentaron en orden inverso, lo que se debe a la heterogeneidad en los tiempos de olfacción.



Gráfica 11. Hay diferencias significativas entre los estímulos ($p=0.0092$) y entre las presentaciones de cada estímulo ($p=0.0015$) –adaptación ante los estímulos- ; sin embargo no hay una diferencia significativa entre grupos. Sólo se observa capacidad de discriminación entre los estímulos *anestro* y *estro* para los machos *expertos* (*), esto se debe a la heterogeneidad de olfacción entre los individuos. No hay diferencia significativa entre grupos.



Gráfica 12. Hay diferencias significativas entre las presentaciones de cada estímulo ($p < 0.0001$) –adaptación al estímulo-. Los *expertos* fueron capaces de discriminar entre los estímulos (**), mientras que los *inexpertos* sólo discriminaron al presentar primero *plátano* y después *menta* (**). Los machos *expertos* prefirieron más la *menta* que los *inexpertos* (+*menta*1). Los *inexpertos* presentaron mayores tiempos de olfacción ante los estímulos *plátano* 2 y ante *menta* 3 (la última impidió la discriminación del estímulo *plátano* presentado después)