



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**RESPUESTA CONDUCTUAL NOCICEPTIVA, LOCOMOTORA Y DE
MEMORIAL ESPACIAL EN RATAS MACHO DE LA CEPA WISTAR
CON BULBECTOMÍA OLFATORIA**

T E S I S

Que presenta

GUMARO GALINDO PAREDES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD EN NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR**

Director de la Tesis:

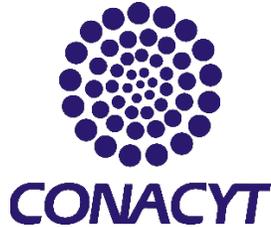
DC JULIO CESAR MORALES MEDINA

Ciudad de México

agosto de 2019

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada con número de registro 632759.



Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** a través del departamento de Becas y estímulos por el estímulo económico para asistir al LXII Congreso nacional de la sociedad mexicana de ciencias fisiológicas, A.C. del 11 al 15 de agosto del 2019 en la Ciudad de Querétaro, Qro.

Al **Laboratorio TLAXCALA- Centro de Investigación en Reproducción Animal “Carlos Beyer Flores” CINVESTAV-UAT**. Por abrirme las puertas para desarrollar la fase experimental y el buen ambiente de trabajo.



Dr. Carlos Beyer Flores

Al **Centro de Investigación en Genética y Ambiente** de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitir el uso de material de laboratorio y la hospitalidad de su personal.



Agradecimientos

Al Dr. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, orientarme y confiar en mí para la realización de este proyecto. Solo decirle: ¡MUCHAS GRACIAS! y seguir trabajándole.

Al Dr. MARCOS NAHMAD BENSUSAN y al Dr. RODOLFO DELGADO LEZAMA por ser parte del comité tutorial, por sus invaluable comentarios y dedicación para la presente tesis.

A los compañeros (os) y amigos (as) que conocí en este fructífero tiempo de maestría: Roció, Adán, Juan Carlos, Juan Manuel, Sandra, Isabel, Paola, Misael, Luis Fernando, Gisela, Jyotsna, Miguel, Misael y Jesús que conocí y conviví el primer año.

A grandes amigos y personas en el Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) o conocido como LABORATORIO TLAXCALA: Ricardo Morales, Patricia Sánchez, Mario Bautista, Ana Celia Lemus, Lizet García, Mariela, Santiago, Jair, Juan Carlos, Doña Marce, Don José, Don Valentín, Doña Susana, Dra. Gabriela, Dr. Toño, Dra. Rosario, Dra. Ángeles y Dr. Pedro.

¡Gracias a todos!

Dedicatoria.

La presente tesis es dedicada a mi Mamá María Victoria Paredes Montiel y a toda mi hermosa familia. ¡Muchas gracias por su apoyo incondicional!

INDICE

Número	Contenido	Página
1.0	INTRODUCCIÓN	9
1.1	El olfato	9
1.2	La bulbectomía olfatoria en rata	10
1.3	Aprendizaje y memoria	11
1.4	Actividad locomotora en el modelo de ratas OBX en la PCA	13
1.5	Efecto de la OBX en la nocicepción	14
2.0	JUSTIFICACIÓN	17
3.0	HIPOTESIS	18
4.0	OBJETIVOS PARTICULARES	18
5.0	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	19
5.1	Diagrama de diseño experimental	19
5.2	Animales de experimentación	19
5.3	Cirugía de la bulbectomía olfatoria (OBX)	20
5.4	Criterios de selección de la muestra	20
5.4.1	Criterios de exclusión	21
5.4.2	Criterios de eliminación	21
5.4.3	Definición de variables y escala de medición	21
5.5	Prueba de perfil característico relacionado con la OBX	22
5.5.1	Prueba de campo abierto (PCA)	22
5.6	Prueba de aprendizaje y memoria espacial	23
5.6.1	Prueba de laberinto acuático de Morris	23
5.7	Pruebas conductuales nociceptivas	24
5.7.1	Prueba de la alodinia mecánica (PAM)	24
5.7.2	Prueba de la alodinia térmica al frío (PATf)	25
5.7.3	Prueba de hiperalgesia mecánica (PHM)	25
6.0	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
7.0	RESULTADOS	26
8.0	DISCUSIÓN	31
9.0	CONCLUSIONES	35
10.0	PERSPECTIVAS	35
11.0	BIBLIOGRAFIA	36
12.0	ANEXO	41

Lista de Abreviaturas

OBX: bulbectomía olfatoria

BO: bulbos olfatorios

BOP: bulbo olfatorio principal

BOA: bulbo olfatorio accesorio

HP: hipocampo

CP: corteza piriforme

CE: corteza entorrinal

CPF: corteza prefrontal

SD: Sprague-Dawley

PCA: prueba de campo abierto

PAM: prueba de alodinia mecánica

PATf: prueba de alodinia térmica al frío

LAM: laberinto acuático de Morris

PHM: prueba de hiperalgesia mecánica

IASP: International Association for the Study of Pain

ABL: amígdala basolateral

NOM: norma oficial mexicana

ANOVA: análisis de varianza

Resumen

El olfato permite a la mayoría de los mamíferos detectar y discriminar odorantes y feromonas que influyen en varias funciones fisiológicas. Los bulbos olfatorios (BO) son una prolongación bilateral del telencéfalo rostral y son una puerta de entrada sensorial importante a regiones corticales y subcorticales. La bulbectomía olfatoria (OBX) en rata produce disfunción en el circuito corteza-hipocampo-amígdala que induce cambios conductuales. Estudios previos con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD) presentaron deterioro en el aprendizaje-memoria espacial usando el laberinto acuático de Morris (LAM), hiperlocomoción en la conducta horizontal y un aumento en la conducta vertical, es decir, la postura erguida y acicalamientos en la prueba de campo abierto (PCA) e incremento en el umbral táctil en la prueba de la alodinia mecánica (PAM) usando los filamentos de Von Frey y en la prueba térmica al frío (PATf). Los estudios se realizaron 15 días postcirugía y usaron el mismo grupo experimental en todas las pruebas. Sin embargo, no se había analizado la conducta nociceptiva en ratas macho Wistar (RMW) en grupos experimentales independientes; y en un curso de tiempo mayor a 30 días postcirugía. Además, hasta donde tenemos conocimiento no se había determinado el aprendizaje inhibitorio y memoria reversa en el LAM con roedores OBX. Por tanto, nuestro objetivo fue evaluar la respuesta conductual nociceptiva, locomotora, y los dos procesos de aprendizaje y memoria en 3 grupos independientes a largo plazo después de la cirugía. En los resultados de la PCA se presentó hiperlocomoción al evaluar la conducta horizontal por el grupo OBX, pero no encontró cambios significativos en la conducta vertical, es decir, en el número de erguidos y acicalamientos. En el grupo de ratas OBX, los resultados indicaron mayor latencia para encontrar la plataforma de escape en el LAM en la primera fase de 5 días consecutivos y también en la fase de 4 días del aprendizaje inhibitorio. Al evaluar la memoria espacial encontramos un menor número de cruzamientos en las 2 pruebas de memoria espacial los días 5 y 11. En la PATf el grupo OBX mostró mayor número de retirada de las extremidades posteriores. En la PAM se encontró que el grupo OBX disminuyó su umbral táctil en un curso de tiempo de 4 semanas postcirugía. En el presente trabajo evaluamos la hiperalgesia mecánica, pero no encontramos alteración en las respuestas del grupo OBX. Concluimos que la remoción de los BO induce una serie de respuestas conductuales alteradas debido a la conexión íntima con regiones que modulan la nocicepción, la novedad y el aprendizaje y memoria.

Abstract

Olfaction enables most mammalian species to detect and discriminate vast numbers of chemical structures called odorants and pheromones. Olfactory bulbectomy (OBX) in rats cause dysfunction in the cortex-hippocampus-amygdala circuit that induces behavioral changes. Previous studies in male rats of the Sprague-Dawley strain (SD) showed deterioration in spatial learning using the Morris water maze (MWM), hyperlocomotion in horizontal behavior and an increase in vertical behavior, that is, rearing and grooming in the open field test (OFT) and decrease?? in the tactile threshold in the mechanical allodynia test (MAT) using the Von Frey filaments and in the cold thermal test (CTT). These studies were conducted 15 days post-surgery and presented several confounding factors. However, nociceptive behavior in male Wistar rats in independent experimental groups had not been analyzed; and analyzed in one single point post- surgery. To the best in our knowledge, inhibitory learning and reverse memory in MWM in OBX rodents had not been determined. Therefore, the objective of the present thesis was to evaluate the multimodal nociceptive response, locomotor behavioral response, and two learning and memory processes in OBX rats. The OBX rats showed hyperlocomotion when assessing horizontal behavior, with no significant changes in rearing and grooming in the OFT. The OBX rats presented greater latency to find the hidden escape platform in the MWM in the first phase of 5 consecutive days (learning) and in the 4-day phase (inhibitory learning). When evaluating the spatial memory, we found a reduced number of crosses in the 2 tests of spatial memory on days 5 and 11. In the CTT, the OBX rats showed thermal cold allodynia. In the MAT, the OBX rats presented mechanical allodynia. Interestingly, when allodynia was presented, it appeared in the right hind paw one week earlier compared to the left hindpaw. In the present work we also evaluated the mechanical hyperalgesia, but we do not find alteration in the responses of the OBX group. We conclude that the removal of BO induced a series of altered behavioral responses due to the intimate connection with regions that modulate nociception, novelty and learning and memory.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 El olfato

El olfato permite a la mayoría de las especies de mamíferos detectar y discriminar un gran número de estructuras químicas llamadas odorantes y feromonas (Wackermannová et al. 2016). Las señales olfativas juegan un papel importante en la regulación de una variedad de funciones biológicas en los mamíferos, entre ellas, el inicio de la pubertad, la sincronización del estro, la ovulación, la identificación de parientes, la elección de pareja, el bloqueo del embarazo y la selectividad de la lactancia (Melo et al. 2010). La percepción de tales compuestos químicos está mediada por dos sistemas olfativos principales, el sistema olfativo principal y el sistema vomeronasal (Órgano Vomeronasal), así como sistemas menores, como el órgano septal y el ganglio de Grueneberg (Wackermannová et al 2016).

La rata posee dos órganos quimiosensoriales en la cavidad nasal: el epitelio olfatorio, que envía axones al bulbo olfatorio principal (BOP), y el órgano vomeronasal, que se proyecta hacia el bulbo olfatorio accesorio (BOA). Alojados en compartimentos anatómicos separados, los BOP y BOA tienen diferentes proyecciones centrales que se distribuyen a lo largo de la superficie medial del prosencéfalo (Brunjes, 1992). Por tanto, los bulbos olfatorios (BO), anatómicamente, son extensiones bilaterales del telencéfalo rostral y constituyen aproximadamente el 4% de la masa cerebral total en la rata adulta (Caín, 1974). Como el sistema olfativo es una modalidad sensorial evolutivamente antigua, transmite información a partes más primitivas del cerebro, específicamente al sistema límbico (Lledo & Saghatelyan, 2005).

El MOB está organizado de manera tangencial y radial, con seis capas bien definidas (Switzer et al., 1985). Hay dos niveles anatómicos de procesamiento dentro del MOB (Macrides & Davis, 1983). El nivel más externo está compuesto por células glomérulares y células de penacho externas, que son principalmente dopaminérgicas y GABAérgicas (Halasz et al., 1977; Switzer et al., 1985). El nivel más interno está compuesto principalmente por células medianas, en forma de penachos internos y mitrales, de naturaleza colinérgica, serotoninérgica,

noradrenérgica, encefalinérgica y de liberación de sustancia P (Halasz & Shepherd, 1983). Las células mitrales se proyectan a núcleos más centrales, como la corteza piriforme (CP) posterior, la amígdala y la corteza entorrinal (CE) (Haberly & Price, 1977). Las células de penacho se proyectan solo a la CP anterior (Haberly & Price, 1977; Switzer et al., 1985; Brunjes, 1992). Las proyecciones del BOA incluyen el tracto olfatorio dorsal, la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST, en inglés) (Leonard & Tuite, 1981; Switzer et al., 1985). Los BO se comunican directamente con el hipocampo (HP) o a través de la CE y CP (Hitti & Siegelbaum, 2014).

La pérdida del olfato se denomina anosmia, para generarla experimentalmente en roedores se utiliza compuestos químicos como el sulfato de Zinc (van Rijzingen et al. 1994). Sin embargo, cuando se realiza la bulbectomía olfatoria (OBX) se induce degeneración neuronal anterógrada y retrógrada en regiones cerebrales que tienen contacto íntimo con los BO (Heimer & Kalil, 1978).

1.2 La bulbectomía olfatoria en rata (OBX)

En la cirugía de la OBX se lleva a cabo la ablación de los BO en edad adulta. La OBX ocasiona una disfunción en el circuito cortico-hipocampo-amígdala, que conduce a cambios anatómicos, conductuales, cognitivos, neuroquímicos, neuroendocrinos e inmunes (Kelly et al., 1997; Song & Leonard, 2005).

Los cambios cognitivos que se presentan en ratas OBX son deterioro en el aprendizaje y memoria espacial usando el laberinto acuático de Morris (LAM) (Redmond et al. 1994, Van Rijzingen et al. 1995, Wang et al. 2010, Morales-Medina et al. 2013), hiperlocomoción en la prueba de campo abierto (PCA) (Klein & Brown, 1969, Morales-Medina et al. 2013) y alodinia e hiperalgesia ante estímulos físicos y químicos (Wang et al. 2010, Burke et al. 2013).

La mayoría de los estudios de la OBX se han realizado en la cepa Sprague-Dawley (SD) en comparación a los realizados en la cepa Wistar. Sin embargo, se han encontrado grandes diferencias en los resultados de estudios al comparar entre ambas cepas. Las ratas de las cepas Wistar presentan mejor desempeño cognitivo

en el paradigma de laberinto radial de 12 brazos (usado para evaluar simultáneamente la memoria de trabajo y de referencia) que la cepa SD (Gökçek-Saraç et al. 2014). Los estudios realizados en la cepa SD para examinar la relación del efecto de la OBX con la nocicepción en pruebas de alodinia e hiperalgesia mecánica y térmica muestran variabilidad en los resultados (Wang et al. 2010, Burke et al. 2013). Sin embargo, los estudios realizados son evaluados una vez y a tiempos cortos.

Los BO están conectados a diversas zonas cerebrales, entre las que destaca el HP que se encarga de la modulación del aprendizaje y la memoria.

1.3 Aprendizaje y memoria

El aprendizaje es el proceso biológico de adquirir nuevos conocimientos sobre el medio que nos rodea y la memoria es el proceso de retener y reconstruir ese conocimiento a través del tiempo (Kandel et al. 2014). Trabajos pioneros de Milner y colaboradores (Scoville & Milner, 1957; Penfield & Milner, 1958; Milner, 1962; Milner et al. 1968) muestran que ciertas memorias a largo plazo dependen del HP y del lóbulo temporal. En el cerebro existen dos tipos principales de memoria: memoria explícita (declarativa) para recordar hechos y eventos, personas, lugares y objetos; y la memoria implícita (no declarativa) para recordar habilidades perceptivas y motrices. En el presente trabajo nos enfocamos en la memoria explícita, ya que implica un sistema de memoria basado en el HP para hechos (semánticos) y eventos (episódicos) donde se necesita una participación consciente para el recuerdo. En este tipo de memoria es importante tomar en cuenta la complejidad de estímulos y sus asociaciones inducidas por el aprendizaje. Una característica definitoria de la memoria explícita, como la memoria dependiente del HP para el espacio, es que requiere atención. La atención es importante para la codificación óptima de la memoria y también para su posterior recuperación al mejorar las respuestas fisiológicas a la información relevante para la tarea a desempeñar, y que el mapa espacial requiere atención específica a las señales espaciales (Muzzio et al. 2009a, 2009b).

Una de las pruebas que permite evaluar el aprendizaje y la memoria espacial es el LAM, desarrollado en 1984 por Richard Morris y las características de esta prueba serán descritas en la sección de metodología. Las mediciones en el LAM incluyen la latencia para encontrar la plataforma de escape, la prueba de sonda (o también llamada memoria espacial) y la distancia de la ruta de navegación (Morris, 1984). La investigación realizada por Morales-Medina et al. (2013) en el LAM entre los días 23-28 postcirugía dio como resultados que sólo en los días 2 y 3 hay una diferencia significativa en el tiempo para encontrar la plataforma de escape del grupo de ratas OBX con respecto al Sham. Pero en los dos últimos días de ensayos (4 y 5) ya no se encontró diferencia entre ambos grupos. En la prueba de memoria espacial se cuantifico el número de cruzamientos en el área donde encontraba la plataforma de escape, pero el grupo OBX no presenta diferencia significativa con el grupo Sham (Figura 1A, b).

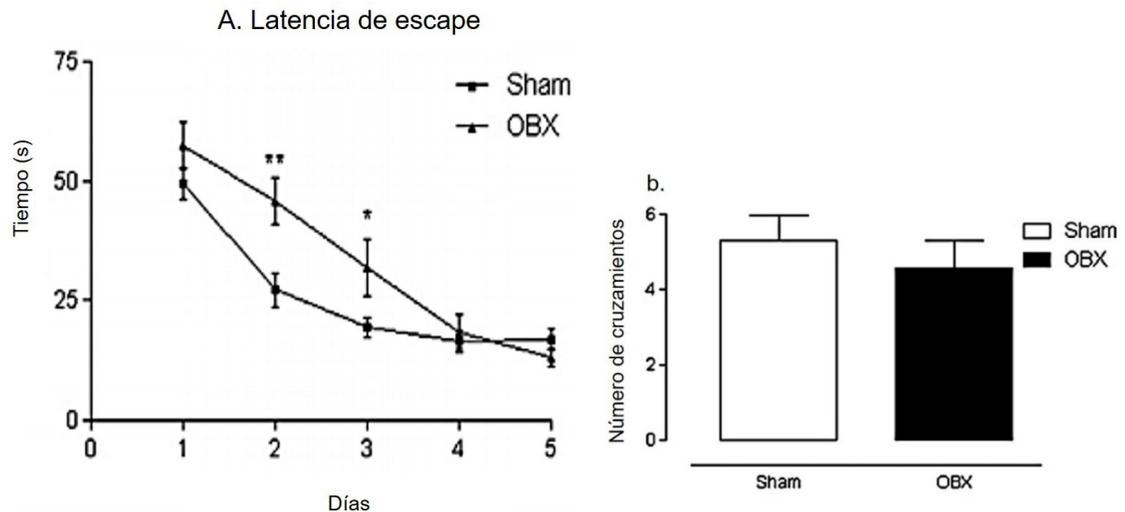


Figura 1. Efecto de la OBX en ratas de la cepa SD en el aprendizaje y memoria espacial en el LAM. A) La latencia de escape de los grupos OBX Y Sham y b) La prueba de sonda cuantifica el número de cruzamientos y nos permite evaluar la memoria espacial. Tomado de Morales-Medina et al. 2013.

Sin embargo, no se ha estudiado en la rata OBX un aspecto importante del aprendizaje y la memoria: la reversión o la extinción de una tarea adquirida previamente, un proceso de adaptación importante que corrige una alteración

ambiental o de la situación a la que este expuesto el sujeto experimental (Bouton, 1993). Estos procesos, denominados aprendizaje inhibitorio, se consideran mecanismos de aprendizaje paralelos que requieren una nueva adquisición de información reciente y la supresión de experiencias adquiridas previamente para adaptarse a situaciones nuevas.

Además de los cambios en la adquisición de la información, la formación de la memoria espacial y los cambios neuroplásticos ante un paradigma experimental como el LAM de ratas SD con OBX, se ha reportado el incremento de la actividad locomotora en la PCA en esta misma cepa después de la cirugía (Klein & Brown, 1969, Wang et al. 2010, Burke et al. 2010, Burke et al. 2013, Morales-Medina et al. 2013). Para interés del presente proyecto, la PCA se realizó para evaluar la locomoción en ratas macho Wistar con OBX.

1.4 Actividad locomotora en el modelo de ratas OBX en la PCA

El incremento del comportamiento exploratorio en una arena abierta como la PCA es uno de los índices más tempranos y más ampliamente aceptados de cambios de comportamiento relacionado con la OBX (Klein & Brown, 1969; Van Rijzingen & Leonard, 1990). La hiperlocomoción inducida por la OBX en la PCA es el resultado de una mayor reactividad a la novedad, donde el sujeto experimental tarda en habituarse a un nuevo entorno estresante (Mar et al. 2000). El diseño de la arena del campo abierto puede ser extremadamente importante, así como la hora del día de la observación del comportamiento. Por ejemplo, la movilidad reducida de los sujetos de experimentación se observa en un campo abierto cuadrado con iluminación de baja intensidad (Stockert et al., 1988). Las características de la arena y la prueba que se llevarán en este proyecto se describen en la sección metodológica.

En el perfil de comportamiento relacionado con ratas OBX de la cepa SD se observó un incremento de la actividad locomotora (distancia recorrida, conocida como conducta horizontal) y el número de eventos como son acicalamientos y erguidos (conocida como conducta vertical) en la PCA del estudio realizado por Morales - Medina (2013) el día 27 postcirugía (**Figura 2**), mismos resultados se obtuvieron en

los estudios realizados en la misma cepa SD por Wang et al. 2010, Burke et al. 2010, Burke et al. 2013 antes de la cirugía y en tiempos cortos (15 días).

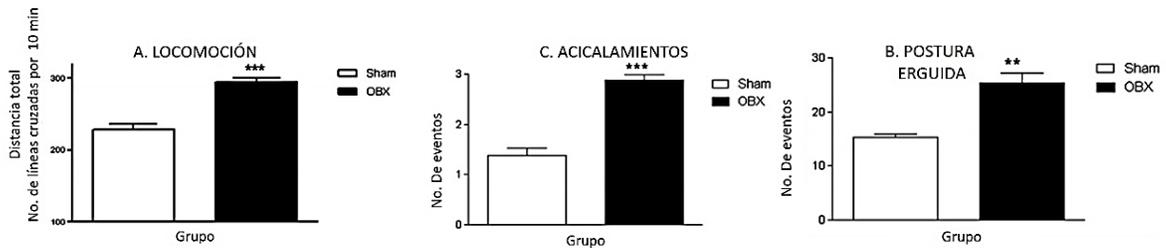


Figura 2. Efecto de la OBX sobre el comportamiento locomotor en el campo abierto de ratas SD. En el campo abierto se evaluó la actividad locomotora, donde el grupo OBX muestra hiperlocomoción con respecto al grupo Sham (con cirugía simulada), así también se cuantificó el número de erguidos y acicalamientos. Modificado de Morales-Medina et al. (2013).

El área cerebral responsable de dirigir los comportamientos adaptativos en respuesta a señales internas y externas es la amígdala basolateral (ABL), así también se ha demostrado que el HP es un área cerebral importante para la novedad (Hitti & Siegelbaum, 2014).

Además, ha surgido el interés de la correlación entre la nocicepción y la OBX en roedores donde se observa alteraciones en la nocicepción en un solo ensayo y a tiempos cortos postcirugía (Belcheva et al. 2009, Shi et al. 2010, Wang et al. 2010, Burke et al. 2013). A continuación, veremos el efecto que tiene la remoción de los BO sobre las conductas nociceptivas.

1.5 Efecto de la OBX en la nocicepción

El dolor se percibe como las experiencias sensoriales y emocionales desagradables asociadas con el daño tisular (IASP por sus siglas en Ingles, 1994). El pinchazo, el ardor, el escozor y el dolor son algunas de las modalidades sensoriales más distintivas. Al igual que las otras modalidades sensoriales somáticas como el tacto, la presión y el sentido de la posición, el dolor cumple una importante función protectora y nos alerta sobre las lesiones que requieren evasión o tratamiento (Basbaum & Julius, 2006). El dolor es diferente a otras modalidades sensoriales somáticas, o como la visión, la audición y el olfato, ya que posee una calidad urgente

y primitiva, y posee componentes afectivos y emocionales (Basbaum & Julius, 2006). La nocicepción es un proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos (Loeser & Treede, 2008).

En el 2010 Wang et al. trabajaron con la rata OBX en las pruebas de nocicepción provocado (alodinia térmica) y el comportamiento del dolor espontáneo (causado por la inyección de formalina en la extremidad trasera) utilizando ratas macho SD. Los resultados obtenidos en las pruebas de nocicepción fue un aumento en la latencia ante el estímulo térmico en el grupo OBX con respecto al grupo Sham y un aumento en comparación a la prueba pre-cirugía (basal) realizada a ambos grupos. Por otro lado, los resultados en la prueba de dolor espontáneo aumento el tiempo del comportamiento de lamer la extremidad trasera del sujeto experimental.

En estudios realizados para demostrar el efecto de la OBX por Burke y colaboradores en 2013, donde usaron ratas SD, los resultados en las pruebas de nocicepción: prueba de la alodinia mecánica (PAM) y de la alodinia térmica al frío (PATf) encontraron que el grupo OBX no tuvo diferencia significativa en la frecuencia de retiro y por tanto alodinia térmica al frío con respecto al grupo Sham. Pero en caso de la prueba de alodinia mecánica, el grupo OBX mostró un umbral táctil menor con respecto al grupo Sham. Sin embargo, el grupo OBX no presento hiperalgesia por calor (ver **Figura 3**).

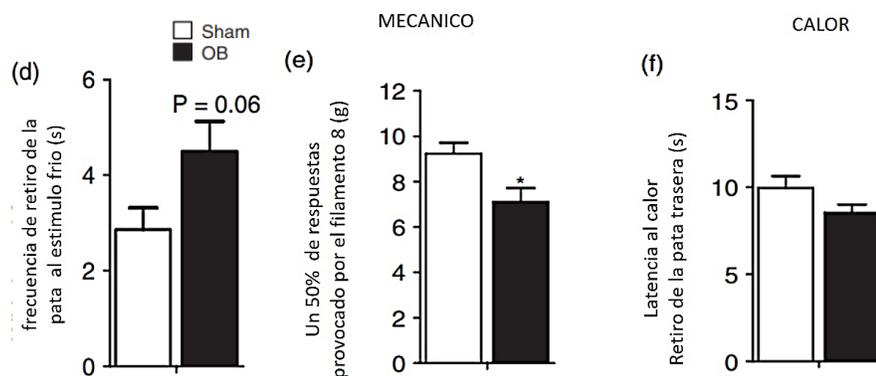


FIGURA 3. Efecto de la OBX en la percepción de dolor previo a la ligación del nervio espinal. En (c) (d) se aprecia una disminución en la latencia y la frecuencia de la retirada de la extremidad trasera (pero no hay diferencia significativa) generado por la alodinia térmica al frío. En (e) (f) se muestra

una disminución al umbral táctil que el grupo control. En la prueba de la alodinia térmica al calor no hay cambio estadísticamente significativo (Burke et al. 2013).

Los resultados de estudios que se han publicado y correlacionan el efecto de la OBX en la nocicepción, nos llevan a descubrir la compleja relación conductual y neurofisiológica que tienen los BO en áreas que tiene una importancia en modular la nocicepción.

2.0 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios para evaluar aprendizaje-memoria espacial y nocicepción en la rata OBX se han realizado en la cepa SD, pero faltan investigaciones en la cepa Wistar ya que se ha demostrado que hay diferencias entre estas cepas. En este trabajo proponemos que la rata de la cepa Wistar es más recomendable usar para evaluar el efecto de la OBX en el aprendizaje-memoria espacial ya que no presenta problemas cognitivos inherentes a la cepa como lo presenta la rata SD. Las diferencias relacionadas con la cepa en la capacidad cognitiva de los animales afectan los resultados experimentales y pueden ser responsables de los resultados discrepantes obtenidos por diferentes grupos de investigación (Gökçek-Saraç et al. 2014).

Además, sugerimos evaluar el aprendizaje inhibitorio y la memoria reversa en la rata OBX ya que nos permitirá dilucidar si los animales OBX tienen o no la capacidad de adaptación cuando hay una alteración en la tarea previamente aprendida (Bouton, 1993).

Los resultados de la PCA en la cepa SD muestran hiperlocomoción en diferentes intensidades de luz (40 W, 300-400 LUX) y a diferentes formas de la arena, circular con diámetros de 75 y 180 cm (Burke et al. 2013, Wang et al. 2010) o cuadrada de 100x100 cm (Morales-Medina, 2013). La PCA en los trabajos de Burke et al. 2013, Wang et al. 2010 se realizaron previos a la cirugía y 15 días después de esta. Por tanto, consideramos que los sujetos experimentales ya no se encuentran ante un medio novedoso en la PCA debido a su exposición previa. Nosotros proponemos evaluar una sola vez el comportamiento de la rata Wistar OBX en una arena de 90x90 cm a una intensidad luminosa de 300 Lux a 5 minutos y 4 semanas postcirugía.

Los resultados experimentales obtenidos por el grupo OBX de ratas SD se muestra variabilidad en la alodinia térmica de calor con respecto a un estímulo inflamatorio persistente (Wang et al., 2010). En los trabajos de Burke et al. 2010 & 2013, el grupo OBX mostró un incremento en la alodinia mecánica en ambas extremidades posteriores y un incremento en las respuestas conductuales nociceptivas (lamer,

morder y levantar las extremidades posteriores) ante un estímulo inflamatorio persistente (Burke et al. 2010). Sin embargo, las pruebas de LAM y nociceptivas (Wang et al. 2010) o la PCA y de nocicepción en el mismo grupo de animales generan estrés que puede afectar los resultados obtenidos en ambas pruebas. Por tanto, proponemos que las pruebas para corroborar la conducta locomotora, el aprendizaje-memoria espacial y de nocicepción se hagan con grupos de ratas separados. Esto permitirá dilucidar mejor el efecto de la OBX en cada prueba.

3.0 HIPOTESIS

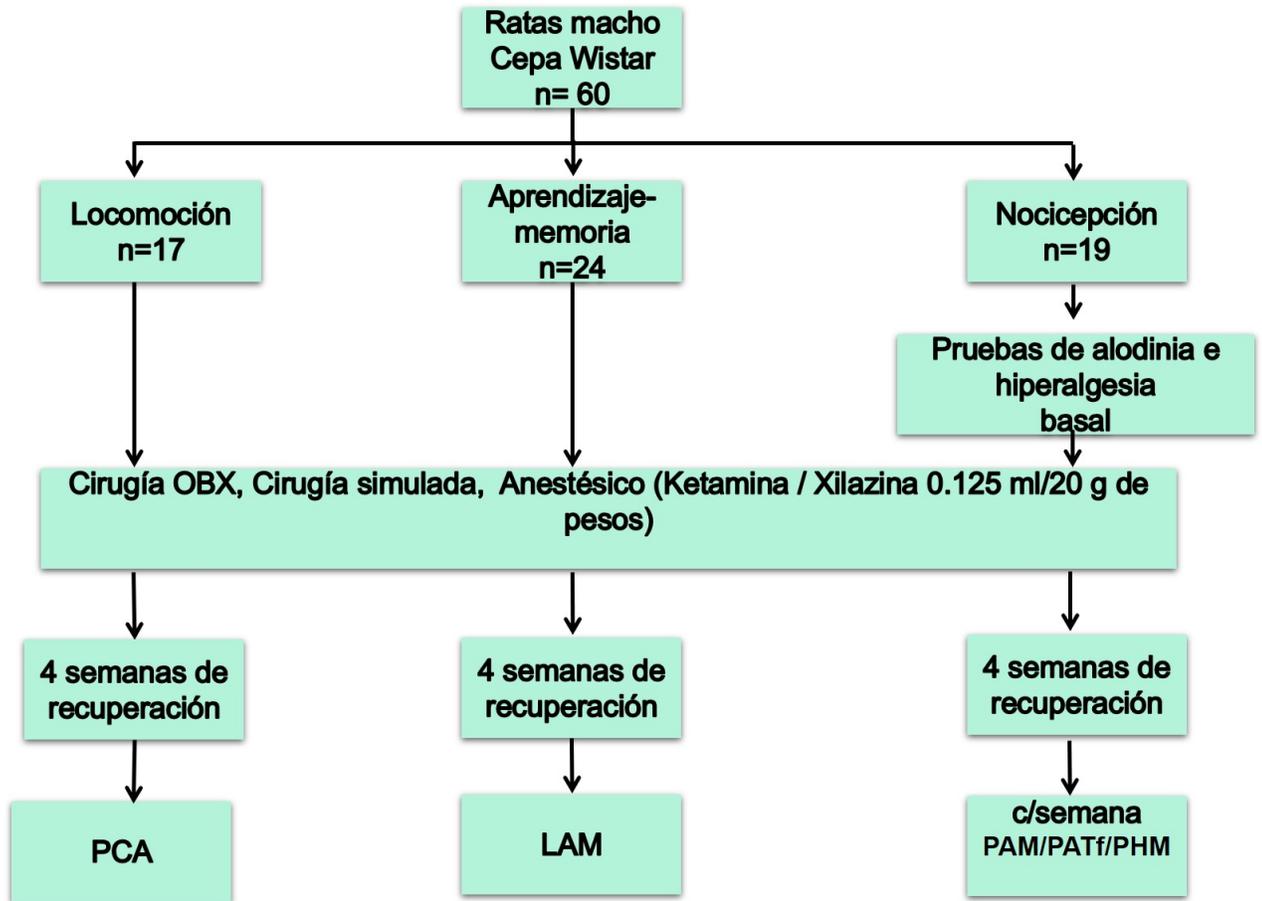
La OBX incrementa las respuestas conductuales nociceptivas, de locomoción y provoca una reducción en el aprendizaje y la memoria espacial en ratas macho Wistar a largo plazo.

4.0 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar las respuestas conductuales de locomoción, postura erguida y acicalamientos de ratas OBX después de 4 semanas postcirugía.
- 2.-Evaluar la conducta de aprendizaje- memoria espacial y el aprendizaje inhibitorio- memoria reversa de ratas OBX después de 4 semanas postcirugía.
- 3.-Determinar las respuestas conductuales nociceptivas en ratas OBX en un curso de tiempo de 4 semanas postcirugía.

5.0 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1 Diagrama de diseño experimental



PAM: Prueba de la alodinia mecánica
PATf: Prueba de la alodinia térmica al frío
PHM: Prueba de hiperalgesia mecánica

5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron en este estudio 60 ratas macho de la cepa Wistar (con un peso de 200-230, Bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal CINVESTAV-UAT) y se alojaron en grupo de cuatro individuos. Con acceso de comida y agua ad libitum. A una temperatura de 22°C +/- 2°C. Un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. El cuidado y el manejo de los animales para los procedimientos experimentales fue aprobado por un comité de cuidado animal del centro de Investigación en reproducción animal (CIRA) del CINVESTAV-UAT de acuerdo con la Norma oficial

mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.3 Cirugía de la bulbectomía olfatoria (OBX)

Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: los animales OBX y el grupo de animales con cirugía simulada (Sham). Las ratas de ambos grupos se anestesiaron con la mezcla Ketamina/xilazina (0.75 ml de Ketamina/ 0.25 ml de Xilazina en 5 ml de solución Hartmann Pisa, dosis: 0.125 ml/20 g de peso, i.p.). Una vez anestesiadas, se rasuró el área frontal de las cabezas de las ratas y se colocaron los sujetos experimentales en una mesa para cirugía, sus cabezas se colocaron en una esponja fijada a la superficie. Se realizó una incisión sagital en la línea media para exponer el cráneo. Se realizó dos orificios de 2 mm de diámetro con las coordenadas de 8 mm rostral a bregma y 2 mm lateral a la línea media por separado usando una herramienta rotatoria inalámbrica 7.2V marca DREMEL 7700. Los BO bilaterales fueron extraídos por vacío y la cavidad se llenó con esponja hemostática (Gelfoam) para controlar el sangrado. Se tuvo cuidado para evitar dañar a la corteza frontal. En el caso del grupo de ratas para la PCA se alojaron nuevamente en grupo de máximo 4 individuos por caja y se dejarán en recuperación por 4 semanas. Cumplidas las 4 semanas, se llevó a cabo un solo ensayo de la PCA (Diagrama de diseño experimental).

Al final de los experimentos, las ratas de los grupos Sham y OBX de las PCA y pruebas de nocicepción se anestesiaron y se realizó la perfusión intracardiaca con una jeringa y solución PBS 1X (300 ml) y solución de paraformaldehído (400 ml). Después se llevó a cabo la extracción de los cerebros para verificar que todos los BO fueron eliminados. Si no, los datos de los sujetos que tengan presencia de BO o daño a la corteza fueron rechazados en el análisis final.

5.4 Criterios de selección de la muestra

Los criterios que se tomaron en cuenta para formar parte de la muestra son el peso de 200-230 g de los sujetos experimentales. En la PAM basal previa a la cirugía los animales debieron presentar un umbral igual o mayor a 10 en ambas extremidades

posteriores. En la PATf basal a los sujetos experimentales no debieron presentar retiro o lamér las extremidades posteriores a evaluar.

5.4.1 Criterios de exclusión

Después de las pruebas correspondientes, se aplicó la perfusión intracardiaca y se extrajo con cuidado los cerebros de los sujetos experimentales. Los cerebros que no tuvieron BO se tomaron en cuenta los datos de las pruebas para los análisis correspondientes, aquellos que tuvieron presencia de BO o daño a la corteza fueron rechazados.

5.4.2 Criterios de eliminación

Fueron eliminadas los sujetos experimentales que fallecieron, enfermaron o bajaron de peso (< 200g) después de la OBX.

5.4.3 Definición de variables y escala de medición

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad
Peso	Es la acción de la fuerza de gravitación sobre la masa de un cuerpo.	Peso de machos > 200 g	Cuantitativa	Numérica	Gramos (g)
OBX	Cirugía para remover los BO por vacío.		Cualitativa	nominal	Presencia o ausencia de BO
Latencia de escape	Tiempo para encontrar la plataforma de escape.	Tiempo de prueba 90 s.	Cuantitativa	Numérica	Segundo (s)
Prueba de memoria espacial	Cruzamientos en el área donde	Tiempo de la prueba 60s.	Cuantitativa	Numérica	Numérica

	estaba la plataforma.				
Conducta vertical: acicalamientos	Evento de aseo	Número de eventos	Cuantitativa	Numérica	Numérica
Postura erguida	Evento de exploración.	Numero de eventos	Cuantitativa	Numérica	Numérica
Conducta horizontal: cuadros visitados	Reactividad de la conducta exploratoria en un medio novedoso.	Número de cuadros visitados	Cuantitativa	Numérica	Numérica
Umbral táctil	Intensidad mínima para responder a un estímulo físico.	Respuesta de retiro de la extremidad	Cuantitativa	Numérica	Numérica
Frecuencia de retiro	Cuántas veces se retira la extremidad posterior ante un estímulo.	Número de eventos.	Cuantitativa	Numérica	Numérica

5.5 Prueba de perfil característico relacionado con la OBX

5.5.1 Prueba de campo abierto (PCA)

Los sujetos experimentales se habituaron una hora previa a la prueba. La PCA se realizó en una caja negra brillante de madera (90x90x90 cm), sin tapa, con campo dividido en 25 cuadros iguales y se usó para analizar los comportamientos locomotores, es decir, el número total de cuadros visitados y además el número de postura erguida y número de acicalamientos de las ratas como previamente se ha descrito en Morales-Medina et al. (2013). La iluminación para el experimento fue de

300 LUX y todos los animales se videograbaron por 5 minutos. En el intervalo entre cada prueba, el campo se limpió con una mezcla de etanol y agua para eliminar las señales olfativas.

5.6 Prueba de aprendizaje y memoria espacial

5.6.1 Prueba de laberinto acuático de Morris

El LAM es una prueba que nos permite valorar la memoria espacial o de referencia a corto y largo plazo (Morris, 1984). El laberinto consiste en una piscina de diámetro de 1.70 metros y dividida en 4 cuadrantes. La piscina se llenó con agua a una altura de 25 cm y temperatura de 26°C +/- 2°C y se coloreó de blanco (Dióxido de Titanio). La plataforma de escape es cuadrada, de acrílico transparente y mide 14.5 cm de ancho y alto 23 cm, por tanto, debe quedar sumergida a 2 cm de la superficie y se colocó en el cuadrante II con respecto al movimiento de las manecillas del reloj. Además, se colocaron señales visuo-espaciales intra-laberinticas (figuras geométricas como el triángulo y cuadrado), una cruz y una X. Las ratas se habituaron una hora en el laboratorio previo a la prueba. Las ratas fueron aleatoriamente escogidas de la caja y se colocaron de forma alternada en uno de los cuatro cuadrantes, el tiempo para que encontraron la plataforma de escape fue de 90 s, si no encontraron la plataforma de escape se le guió a la plataforma y antes de retirarlos se les dejó 15 segundos en ella. El número de ensayos fue de 3 durante 5 días consecutivos, después de la fase de la adquisición de aprendizaje en el día 5, se realizó la prueba de sonda de 60 s para el cual se retiró la plataforma de la piscina. Se evaluó el número de veces que el animal nadó sobre la ubicación donde se encontraba la plataforma, después se dejaron descansar 2 días.

Siguiendo el procedimiento de Ménard & Quirion (2012), después de la primera semana de entrenamiento, todos los animales fueron expuestos a un paradigma para evaluar el aprendizaje inhibitorio y la memoria reversa. Brevemente, la plataforma se movió al cuadrante opuesto mientras que la posición de las señales visuales se mantuvo igual. Las ratas fueron entrenadas para encontrar la nueva

ubicación de la plataforma durante cuatro días consecutivos (tres ensayos por día). Se realizó una segunda prueba de sonda al final del último día (día 11).

Después de cada ensayo, las ratas se colocaron inmediatamente bajo una lámpara de calor para secar y prevenir la hipotermia. Para controlar los posibles efectos debidos a los ciclos circadianos, todos los ensayos se realizaron aproximadamente a la misma hora del día entre las 10:00 y las 15:00 h. Los datos derivados de la prueba LAM se registraron en una computadora utilizando un sistema de seguimiento de video (cámara Canon).

Para el grupo de ratas Wistar OBX y Sham del LAM se anestesiaron (solución de Ketamina/Xilazina, con una dosis: 0.125 ml/ 20 g de peso, IP) y se realizó a cabo la perfusión intracardiaca sólo con solución isotónica Haffmann (400 mL). Después se llevó a cabo la extracción de los cerebros para verificar que todos los BO fueron eliminados y aplicar el criterio es de exclusión.

5.7 Pruebas conductuales nociceptivas

5.7.1 Prueba de la alodinia mecánica (PAM)

La arena que se utilizó para la PAM consistió en una arena Perspex de seis compartimientos (11 × 20 × 15 cm) con un piso de malla de alambre. Las ratas se habituaron a la arena durante 60 minutos antes de la prueba, después de lo cual se usaron filamentos de Von Frey (evaluadores sensoriales Touch Test®, North Coast Medical, Inc., Gilroy, CA, EE. UU.) de diferentes fuerzas para determinar el umbral de retiro del 50% (Moriarty et al. 2012). Brevemente, los filamentos se aplicaron perpendiculares a la superficie plantar de la extremidad posterior, con la fuerza suficiente para causar un ligero dobléz del filamento, durante un máximo de 3 segundos o hasta que se encoja, lamé o retiré la extremidad posterior el sujeto experimental. Se aplicaron filamentos de fuerza creciente desde el número 4 hasta el 8 a las extremidades posteriores izquierda y derecha de acuerdo con la metodología usada por Chaplan et al. (1994). La PAM se realizó antes de la cirugía

y una prueba por semana durante 4 semanas después de la cirugía OBX, la realizó un experimentador ciego al procedimiento de tratamiento.

5.7.2 Prueba de la alodinia térmica al frío (PATf)

La PATf se utilizó para medir la respuesta a un estímulo de frío inocuo (Moriarty et al. 2012). Los animales se colocaron en cámaras individuales en un piso de malla elevado y se dejaron habituar durante 1 hora como en el ensayo de Von Frey. Una jeringa de 5 ml se llenó de acetona y se aplicó una gota a la superficie plantar de las extremidades posteriores (izquierda y derecha) de los sujetos experimentales. Se registró la latencia para responder y/o la frecuencia de extracción o retirada de la extremidad (número de respuestas) en 60 segundos. Una respuesta positiva se considerará como un estremecimiento, lamer o la retirada de la pata trasera. Si el animal no respondiera dentro de los 60 segundos, este valor se tomó como latencia. Cada animal recibirá 2 ensayos en total por extremidad, alternando entre izquierda y derecha, con al menos un intervalo de 3 minutos. La prueba se realizó antes de la cirugía y una prueba por semana durante 4 semanas después de la cirugía OBX, la realizó un experimentador ciego al procedimiento de tratamiento.

5.7.3 Prueba de hiperalgesia mecánica (PHM)

Los animales se colocaron en cámaras individuales en un piso de malla elevado y se dejarán habituar durante 1 hora como en el ensayo de Von Frey. Con un objeto de punta afilada se aplicó un pinchazo en la superficie plantar de las extremidades posteriores (izquierda y derecha) de los sujetos experimentales. Se registró la latencia para responder y/o la frecuencia de extracción o retirada de la extremidad en 60 segundos. Cada animal recibió 1 pinchazo en el ensayo por extremidad, alternando entre izquierda y derecha, con al menos un intervalo de 3 minutos. La prueba se realizó antes de la cirugía y una prueba por semana durante 4 semanas después de la cirugía OBX, la realizó un experimentador ciego al procedimiento de tratamiento.

6.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos, los datos se presentaron como las medias +/- error estándar de la media (S.E.M.). El análisis estadístico para la PCA y la prueba de memoria espacial se llevó a cabo la Prueba Mann-Whitney. Para las pruebas de conducta en el LAM (aprendizaje) y nociceptivas se utilizó una ANOVA de dos vías, seguida de un post hoc prueba de Bonferroni para comparaciones con respecto al tiempo. Se usó el software GraphPad Prism. Se fijó un valor para $*p < 0.05$ para ser significativo.

7.0 RESULTADOS

El grupo OBX presentó hiperlocomoción en la PCA. Sin embargo, no hay cambio en la conducta vertical.

Al finalizar las 4 semanas se realizó la PCA donde se cuantificó el número de cuadros visitados y se obtuvo un incremento en el número de cuadros visitados del grupo OBX con respecto del grupo Sham (Gráfica 4A, Prueba Mann-Whitney, $** P = 0.0086$). En el número de eventos de postura erguida y acicalamientos no hubo diferencia significativa entre el grupo OBX y el Sham (Gráfica 4 B y C).

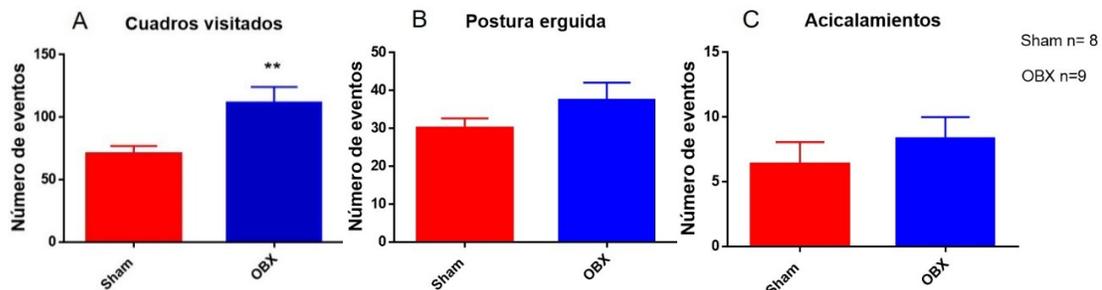


Figura 4. Efecto de la OBX sobre la locomoción en la PCA. En A se cuantifica el número de cuadros visitados por el grupo Sham y OBX, se encontró diferencia significativa. En B se cuantificó el número de eventos, es decir, el número de veces que los sujetos experimentales ejecutaron una postura erguida, pero no hay diferencia significativa entre los grupos. En C se cuantificó los acicalamientos entre el grupo Sham y OBX, pero no hay diferencia significativa. Los datos son expresados como la media +/- SEM, $** P < 0.01$.

El grupo de ratas OBX presentan déficit de aprendizaje y aprendizaje inhibitorio.

Las ratas OBX presentaron problemas para la adquisición y la formación de la memoria espacial en el LAM después de 4 semana de la cirugía (Figura 5A). Las ratas OBX necesitaron mayor tiempo para localizar la plataforma de escape con respecto al grupo Sham y hay una diferencia significativa los días 3, 4 y 5 de entrenamiento (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M. interacción $F_{(4, 110)} = 2.303$ $p = 0.0629$, días $F_{(4, 110)} = 9.375$ $p < 0.0001$, tratamiento $F_{(1, 110)} = 52.29$ $p < 0.0001$). En la prueba de aprendizaje inhibitorio y memoria reversa se encontró que el grupo de ratas OBX tarda más tiempo en localizar la nueva posición de la plataforma con respecto al grupo Sham y hay una diferencia significativa los 4 días de la prueba (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M. interacción $F_{(3, 88)} = 0.1263$ $p = 0.9443$, días $F_{(3, 88)} = 1.038$ $p = 0.3798$, tratamiento $F_{(1, 88)} = 60.75$ $p < 0.0001$) (Figura 5 B).

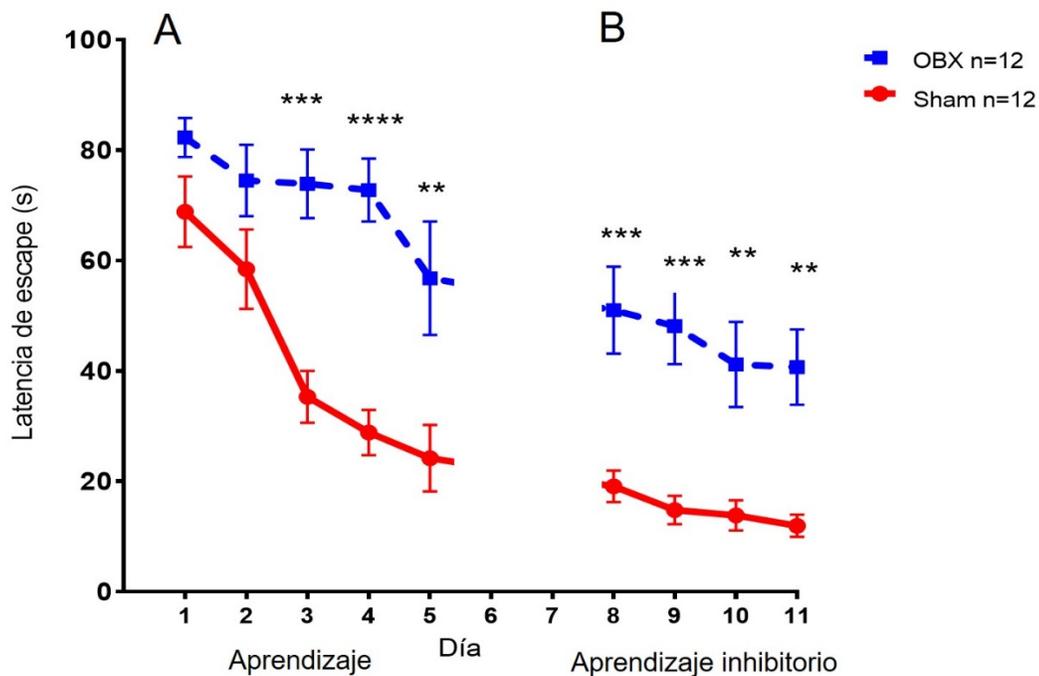


Figura 5. Análisis del aprendizaje-memoria espacial y aprendizaje inhibitorio-memoria de reversa en ratas OBX. (A) El grupo de ratas OBX exhibió mayor latencia para localizar la plataforma de escape que el grupo SHAM. (B) En la prueba de aprendizaje inhibitorio y memoria reversa el grupo OBX presentó mayor latencia que el grupo SHAM (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M., ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

El grupo de ratas OBX cruzan menos el área donde se encontraba la plataforma en la prueba de memoria espacial y memoria reversa.

En los días 5 y 11 se realizaron las pruebas de sonda, donde se retiró la plataforma de escape. Se cuantificó el número de cruzamientos en el área donde se encontraba la plataforma y los resultados indicaron que el grupo de ratas OBX cruzó menos el área que el grupo Sham (prueba t student no pareada, los datos son expresados como la media \pm S.E.M., 3.444 ± 0.242 vs 0.875 ± 0.125 , 3.333 ± 0.2357 vs 1.125 ± 0.125 , $***p < 0.001$, $****P < 0.0001$, Figura 6 A, B).

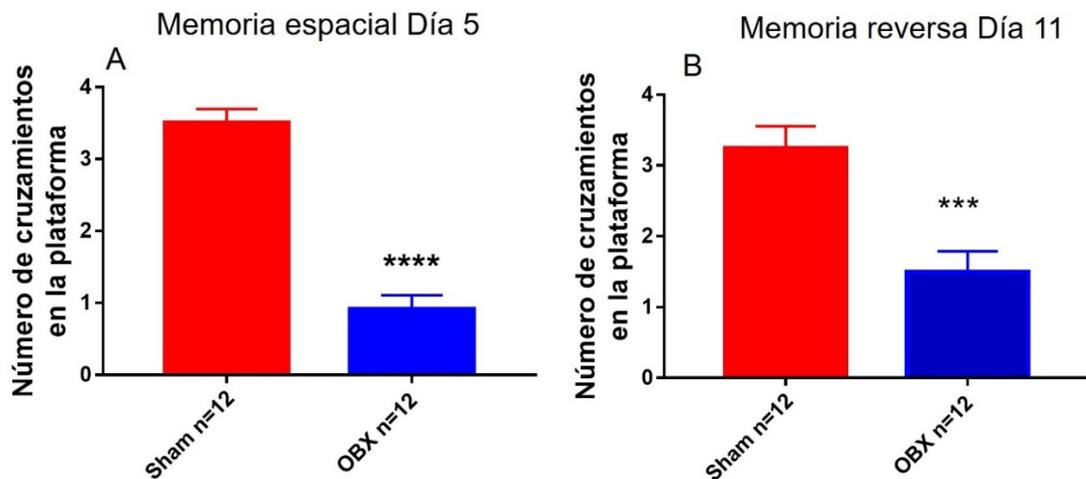


Figura 6. Prueba de la sonda. (A) el grupo de ratas OBX obtuvo menor número de cruzamientos en día 5. (B) Se realizó nuevamente la prueba de sonda en el día 11 para el aprendizaje inhibitorio y memoria reversa y el grupo de ratas OBX presentó menos número de cruzamientos que el grupo Sham. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M. $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

El grupo de ratas OBX presento alodinia térmica al frio, alodinia mecánica pero no hiperalgesia mecánica.

El grupo de ratas OBX presentaron disminución significativa en el umbral táctil en la extremidad posterior izquierda en la semana 3 y 4 post cirugía con respecto al grupo Sham (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M. interacción $F(4, 85 = 2.299)$ $p = 0.0654$, semanas $F(4, 85 = 6.382)$ $p = 0.0002$, tratamiento $F(1, 85 = 25.65)$ $p < 0.0001$). En la extremidad derecha del grupo OBX también presentaron una disminución significativa en el umbral en la semana 2, 3 y

4 post cirugía con respecto al grupo Sham (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M. interacción $F_{(4, 80)} = 2.239$ $p = 0.0721$, semanas $F_{(4, 80)} = 6.552$ $p = 0.0001$, tratamiento $F_{(1, 80)} = 29.33$ $p < 0.0001$) (Figura 7 A, B).

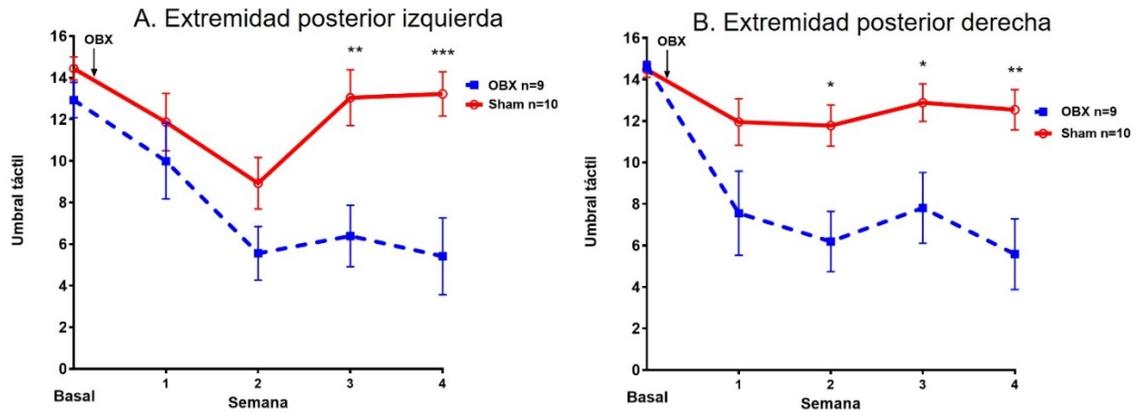


Figura 7. Respuesta nociceptiva de los grupos OBX y Sham ante un estímulo mecánico. (A) El grupo de ratas OBX presentó disminución significativa del umbral táctil en la PAM con respecto al grupo Sham en la extremidad posterior izquierda. (B) En la PAM en la extremidad posterior derecha también se observó diferencia significativa entre el grupo de ratas OBX y el grupo Sham. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M. ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los animales OBX presentaron alodinia térmica al frío, expresada en una mayor frecuencia de la retirada de la extremidad posterior izquierda en las semanas 2, 3 y 4 con respecto al grupo Sham (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M., interacción $F_{(4, 85)} = 3.145$ $p = 0.0184$, semanas $F_{(4, 85)} = 6.356$ $p = 0.0002$, tratamiento $F_{(1, 85)} = 43.03$ $p < 0.0001$) (Figura 8A). En los resultados obtenidos en la extremidad posterior derecha hay una mayor frecuencia de retirada del grupo de ratas OBX en comparación al grupo Sham desde la semana 1 hasta la 4 postcirugía (ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, los datos son expresados como la media \pm S.E.M., interacción $F_{(4, 85)} = 2.731$ $p = 0.0343$, semanas $F_{(4, 85)} = 3.686$ $p = 0.0081$, tratamiento $F_{(1, 85)} = 36.53$ $p < 0.0001$) (Figura 8B).

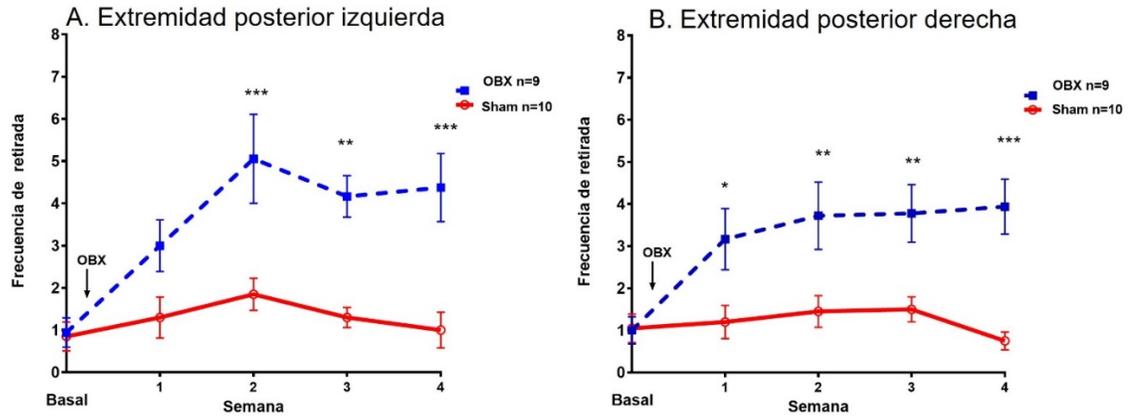


Figura 8. Determinación de la respuesta nociceptiva en la prueba de alodinia térmica al frío. (A) El grupo de ratas OBX presento mayor frecuencia de retirada la extremidad posterior izquierda que el grupo Sham en las semanas 2,3,4 post cirugía. (B) El grupo de ratas OBX presentaron un incremento en el número de retiradas en la extremidad derecha con respecto al grupo Sham en las semanas 1, 2, 3 y 4. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M. ANOVA de dos vías, post hoc Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Las ratas OBX no presentaron hiperalgesia mecánica, expresada en la latencia de la retirada de las extremidades posteriores izquierda y derecha al recibir un pinchazo, con respecto al grupo Sham (Figura 9A, B).

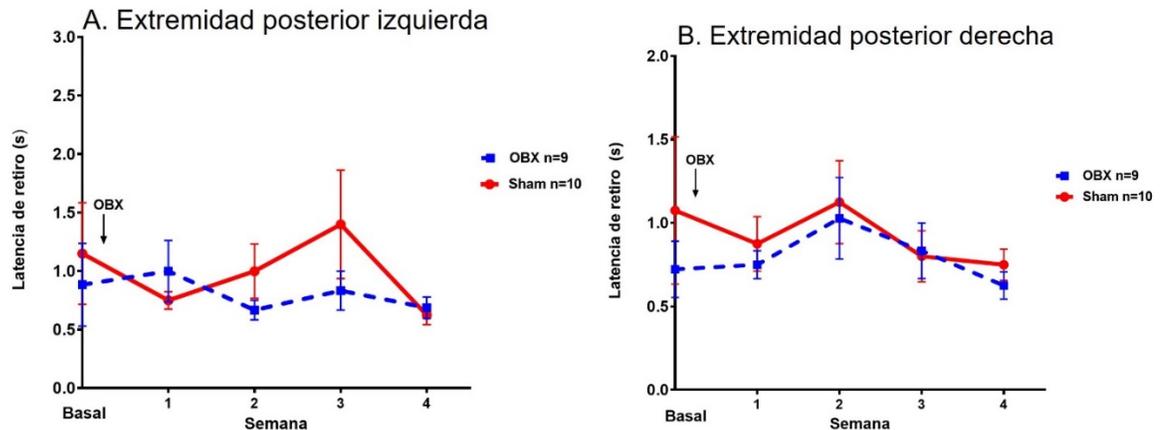


Figura 9. Hiperalgesia mecánica de los grupos OBX y SHAM ante un estímulo mecánico. (A) El grupo de ratas OBX no presentó diferencia significativa en la prueba preliminar de hiperalgesia mecánica con el grupo SHAM en la extremidad posterior izquierda. (B) En la extremidad posterior derecha no se observó diferencia significativa entre el grupo de ratas OBX y el grupo SHAM. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M.

8.0 DISCUSIÓN.

Los resultados del estudio del grupo de ratas OBX macho de la cepa Wistar mostraron déficit de aprendizaje y memoria espacial. Además, el grupo OBX presentó déficit en el aprendizaje inhibitorio y la memoria reversa, es decir, la capacidad de adaptación ante una alteración de la ubicación de un elemento (la plataforma de escape) en el paradigma del LAM. Además, en los resultados de la PCA se encontró hiperactividad en el grupo OBX en lo referente al número de cuadros visitados, pero no en el número de acalamientos y postura erguida. En las pruebas de nocicepción se encontró incremento en la alodinia mecánica y térmica sin hiperalgesia mecánica entre el grupo OBX y Sham.

Alteración en el aprendizaje-memoria espacial y en el aprendizaje inhibitorio-memoria reversa.

La rata OBX ha mostrado déficits de aprendizaje y memoria de trabajo y de referencia en paradigmas como el aparato de pista de 3 paneles, la prueba operante de 3 palancas, la prueba de aprendizaje invertido en un aparato de 2 palancas y la prueba de tiempo de reacción en serie de 3 opciones (Yamamoto et al., 1997). Sin embargo, ninguna de estas pruebas se usa ampliamente para evaluar tareas relacionadas con la memoria en roedores.

Una de las pruebas más usadas para evaluar el aprendizaje y memoria espacial en roedores es el LAM (D'Hooge & De Deyn, 2001). En el presente trabajo, mostramos que el grupo de ratas OBX machos de la cepa Wistar exhibieron deficiencia en el aprendizaje para encontrar la plataforma de escape en los 5 días de entrenamiento. Sin embargo, en el estudio realizado por Morales-Mediana et al. (2013) los resultados en el grupo de ratas OBX de la cepa SD sólo mostraron deficiencia en ubicar la plataforma en los días 2 y 3 de entrenamiento, pero en el día 4 y 5 ya no se observó diferencia entre los grupos. Por otra parte, en el estudio de Wang et al. (2010) el grupo de ratas OBX también de la cepa SD no encontraron la plataforma de escape los 4 días de entrenamiento. Probablemente se debe a que el grupo OBX

del estudio de Wang et al. (2010) estuvo expuesto a estrés adicional por la PCA y a las pruebas de alodinia térmica y mecánica antes y después de la cirugía.

Por otro lado, la memoria de referencia espacial, un término acuñado por Honig (1978) y luego usado por Olton, Becker & Handelman (1979), se refiere a la información espacial que se usa una y otra vez y generalmente se obtiene como resultado de entrenamiento repetido, por lo tanto, experimentando una consolidación en el tiempo y mostrando una mayor resistencia a la interferencia. Con respecto al análisis de la memoria espacial en la prueba de Sonda, el grupo de ratas OBX presentó déficit de la memoria espacial ya que cruzaron menos veces el área donde se encontraba la plataforma de escape. Sin embargo, no hubo cambios entre los grupos OBX y Sham en la prueba de memoria espacial (sonda) demostrado por Morales-Medina et al. (2013). En los resultados de Wang et al. (2010) se evaluó el porcentaje de tiempo de exploración del grupo OBX de la cepa SD en el área donde se encontraba la plataforma y fue significativamente menor en comparación al grupo Sham en la prueba mencionada.

Según nuestro conocimiento, no hay reportes hasta el momento sobre el efecto de la OBX en rata en el aprendizaje inhibitorio y la memoria reversa. El aprendizaje inhibitorio y la memoria reversa es la reversión o la extinción de una tarea adquirida previamente, un proceso de adaptación importante que corrige una alteración ambiental o de la situación a la que este expuesto el sujeto (Bouton, 1993). Los resultados del aprendizaje inhibitorio en el LAM revelaron que el grupo OBX no tuvo la capacidad de adquirir nueva información y de suprimir las experiencias adquiridas previamente para adaptarse a situaciones nuevas en el ambiente (Xu et al. 2009) debido a que presentó una mayor latencia de escape con respecto al grupo Sham. La segunda prueba de memoria espacial para analizar la memoria reversa se llevó a cabo el día 11 y los resultados muestran que el grupo OBX cruzo menos veces el área donde se encontraba la plataforma de escape con respecto al grupo Sham. En el estudio realizado por Ménard & Quirion (2012), modifican también el protocolo en el LAM para evaluar la memoria espacial y el aprendizaje inhibitorio-memoria reversa, encontraron que ratas con problemas cognitivos debido al envejecimiento

presentan un deterioro grave para codificar nueva información espacial. En el grupo de ratas OBX también presentan problemas cognitivos a tiempos cortos después de la cirugía (Wang et al. 2010) y este estudio demuestra que a 4 semanas el problema persiste.

Además, la diferencia de resultados de aprendizaje y memoria de los estudios de Wang et al. 2010 y Morales-Medina et al. (2013) y el nuestro es probablemente por la cepa, como se mencionó anteriormente Gökçek-Saraç et al. (2014) mostraron que la susceptibilidad al estrés en diferentes cepas (SD, Wistar, LE) afecta la capacidad cognitiva y puede ser responsable de los resultados discrepantes obtenidos por diversos grupos de investigación.

En el modelo OBX se provoca degeneración neuronal a áreas que están involucradas en el aprendizaje y la memoria como la CPF, la amígdala y el HP (Carlsen et al. 1982), además de cambios plásticos en el HP en ratas SD (Morales-Medina, 2013) siendo probablemente la causa que se refleja en los resultados de la cepa Wistar en el LAM.

El grupo OBX presentó hiperactividad en la PCA.

La hiperlocomoción inducida por la OBX en la PCA es el resultado de una mayor reactividad a la novedad, donde el sujeto experimental tarda en habituarse a un nuevo entorno estresante (Mar et al. 2000). En la PCA se encontró hiperactividad en el grupo OBX, es decir, en la conducta horizontal. Sin embargo, es importante mencionar que la conducta vertical donde se cuantifico acicalamientos y postura erguida no hubo diferencia con el grupo Sham.

Trabajos previos, mostraron hiperactividad en los tres parámetros evaluados en ratas macho SD (Morales-Medina 2013, Wang et al. 2010, Burke et al. 2013). Sin embargo, el tamaño y forma de la arena y la intensidad luminosa en los trabajos de Wang et al. (2010) y Burke et al. (2013) son diferentes a las nuestras. Nuestro trabajo presentó la intensidad luminosa (300LUX) y las mismas medidas y tipo de material de la arena del trabajo realizado por Morales-Medina (2013). El tiempo de evaluación de la locomoción se desarrolló 4 semanas después de la cirugía y una

sola PCA. Contrario a los trabajos de Wang et al. (2010) y Burke et al. 2013 que se realizaron antes y 14-15 días después de la OBX.

El grupo OBX presenta alodinia mecánica y térmica al frío, pero no hiperalgesia mecánica

Analizamos los efectos conductuales de la OBX en tres paradigmas que permiten cuantificar las alteraciones en la nocicepción: la prueba de alodinia mecánica, prueba de alodinia térmica al frío y la prueba de hiperalgesia mecánica en ratas macho Wistar. Es relevante notar que la OBX indujo dos tipos de alodinia de larga duración en ambas extremidades posteriores de las ratas. Además, el desarrollo de la alodinia está presente más rápido en la extremidad derecha en comparación de la extremidad izquierda. En un estudio anterior, Burke et al. (2013) observaron que la OBX indujo alodinia mecánica 14 días después de la cirugía. Además, Wang et al. (2010) mostro un aumento de la latencia a un estímulo térmico en el grupo OBX. Ambos estudios se llevaron a cabo en ratas SD. Este es el primer estudio que evalúa un curso de tiempo de como la eliminación de los BO induce alteraciones de nocicepción en tres pruebas claves.

Además, de los datos encontrados en la rata OBX existen numerosos modelos de dolor en roedores. Estos modelos podrían dividirse en modelo de dolor inflamatorio y persistente. Dentro del primer grupo, se encuentra la administración del adyuvante completo de Freund (CFA) y la carragenina en la extremidad posterior donde se presentó edema y alodinia mecánica en el sitio de administración con duración de horas o algunos días (Morales-Medina et al., 2017; Morales- Medina et al., 2019). En relación con los modelos de dolor persistente, el modelo de lesión del nervio espinal (LNE) implica la lesión de dos de las tres ramas terminales del nervio ciático (nervios tibial y peroneo común), induce alodinia térmica al frío y mecánica, así como también hiperalgesia mecánica (Decosterd & Woolf, 2000). Además, la lesión parcial del nervio ciático (LPNC) indujo alodinia mecánica e hiperalgesia sin afectar la prueba de alodinia térmica al frío (Seltzer et al., 1990). En ambos modelos, la LNE y la LPNC, los síntomas de comportamiento se observan en cuestión de horas y en ambas extremidades (Seltzer et al., 1990; Decosterd & Woolf, 2000). Los modelos

inflamatorios y persistentes de dolor tienen desventajas. Mientras los efectos inflamatorios presentan un efecto a corto plazo, los modelos de dolor persistente se basan principalmente en la disección de los nervios periféricos y dicha patología no se ve en la clínica (Mogil, 2009). En este sentido, OBX podría ser un modelo interesante ya que la alodinia observada es causada por una alteración en el sistema central, no en la periferia, y podría ser de interés para probar posibles fármacos antinociceptivos.

9.0 CONCLUSIONES

Los resultados de las conductas analizadas en ratas OBX macho Wistar mostraron déficits cognitivos. Además, el grupo OBX presentó incapacidad de adaptarse a un medio novedoso, pero no conducta ansiogénica. Las ratas OBX presentaron alodinia térmica y mecánica pero no hiperalgesia mecánica. La remoción de los BO induce una serie de respuestas conductuales alteradas debido a la conexión íntima con regiones que modulan la nocicepción, la novedad y el aprendizaje-memoria.

10.0 PERSPECTIVAS

- 1.- Analizar los cambios plásticos de las neuronas de la CPF, amígdala y el HP en ratas OBX con 4 semanas postcirugía.
- 2.- Evaluar el papel de la neuroinflamación en la CPF, amígdala y el HP en ratas OBX a largo plazo.
- 3.- Analizar la actividad neuronal en la CPF, amígdala y el HP con el marcador c-fos en ratas OBX con 4 semanas postcirugía.
- 4.- Determinar la conducta nociceptiva y memoria espacial en la cepa SD bajo las mismas condiciones a las que evaluó a la cepa Wistar.

11.0 BIBLIOGRAFIA

Basbaum AI, Julius D. (2006). Toward better pain control. *Sci Am* 294:60–67.

Belcheva, I., Ivanova, M., Tashev, R., Belcheva, S. (2009). Differential involvement of hippocampal vasoactive intestinal peptide in nociception of rats with a model of depression, *Peptides* 30 (8) 1497–1501.

Bouton, ME. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* ; 114:80–99.

Brunjes, P. C. (1992) Lessons from lesions: the effects of olfactory bulbectomy. *Chem. Senses* 17: 729-763.

Burke, N.N., Geoghegan, E., Kerr, D.M., Moriarty, O., Finn, D.P. & Roche, M. (2013). Altered neuropathic pain behaviour in a rat model of depression is associated with changes in inflammatory gene expression in the amygdala. *Genes, brain, and behavior*, **12**, 705-713.

Burke, NN, Hayes E, Calpin P, Kerr DM, Moriarty O, Finn DP, Roche M.

Enhanced nociceptive responding in two rat models of depression is associated with alterations in monoamine levels in discrete brain regions. *Neuroscience*. 2010 Dec 29;171(4):1300-13.

Cain, D.P., (1974). The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol. Bull.* 81, 654–671.

Carlsen, J., De Olmos, J., Heimer, L., (1982). Tracing of two-neuron pathways in the olfactory system by the aid of transneuronal degeneration: projections to the amygdaloid body and hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 208, 196–208.

Carrasquillo Y, Gereau RW (2007) Activation of the extracellular signal regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci* 27:1543–1551

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53 55-63

Decosterd, I. & Woolf, C.J. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, **87**, 149-158.

D'Hooge R, De Deyn PP (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60–90.

Gökçek-Saraç, Çiğdem, Malgorzata Wesierska, Ewa Jakubowska-Doğru. (2014). Comparison of spatial learning in the partially baited radial-arm maze task between commonly used rat strains: Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, and outcrossed Wistar/Sprague-Dawley. *Learn Behav.*, 43:83–94

Haberly, L. B. & Price, J. L. (1977). The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 129: 152-157.

Halasz, N., et al. (1977). Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res.* 126: 455-474.

Halasz, N. & Shepherd, G. M. (1983). Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10: 759-819.

Heimer, L. Kalil, R. Rapid transneuronal degeneration and death of cortical neurons following removal of the olfactory bulb in adult rats, *J. Comp. Neurol.* 178 (3) (1978) 559–609

Hitti, F.L. Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory, *Nature* 508 (7494) 88–92.

Honig, W. K. (1978). Studies of working memory in the pigeon. In S. Hulse, H. Fowler, & W. K. Honig (Eds), *Cognitive processes in animal behavior* (pp. 211–248). Hillsdale, NJ: Erlbaum

IASP, 1994. Part III: (pp 209-214). *Classification of Chronic Pain, Second Edition*, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, ISAP Press, Seattle, 1994.

Kandel, E. Dudai, Y. Mayford, M. (2014). The molecular and systems biology of memory. *review CELL* 157, 163-186

Kelly, J.P., Wrynn, A., Leonard, B.E., (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol. Ther.* 74, 299–316.

- Klein, D. & Brown, T. S. (1969).** Exploratory behavior and spontaneous alternation in blind and anosmic rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 68: 107-110.
- Leonard, B. E. & Tuite, M. (1981).** Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 251-286.
- Lledo, P.M., Saghatelian, A. (2005).** Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* 28 (5) 248–254.
- Loese JD & Treede RD. (2008)** The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* Jul 31;137(3):473-7.
- Macrides, F. and Davis, B. J. (1983)** The olfactory bulbs. In: *Chemical Neuroanatomy*, pp. 391-426, Emson, P. C. (ed.) Raven Press, New York.
- Mar, A. et al. (2000).** Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 150 (1) 52–60.
- Melo, A.I. Gonzalez-Mariscal, G. (2010).** Communication by olfactory signals in rabbits: its role in reproduction, *Vitam. Horm.* 83 351–371.
- Ménard, C & Quirion, R. Successful Cognitive Aging in Rats: A Role for mGluR5 Glutamate Receptors, Homer 1 Proteins and Downstream Signaling Pathways. PLoS ONE.**
- Milner, B. (1962).** Les troubles de la mémoire accompagnant des lésions hippocampiques bilatérales. In *Physiologie de l'Hippocampe*, P. Passouant, ed. (Paris: Centre National de la Recherche Scientifique), pp. 257–272.
- Milner, B., Corkin, S., and Teuber, H.-L. (1968).** Further Analysis of the Hippocampal Amnesic Syndrome: 14-Year Follow-Up Study of H.M. *Neuropsychologia* 6, 215–234.
- Mogil, J.S. (2009)** Animal models of pain: progress and challenges. *Nature reviews. Neuroscience*, **10**, 283-294.
- Morales-Medina, et al. (2013).** Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience* 236 233–243.

- Morales-Medina, J.C.,** Griffiths, N.H., Flores, G., Mastranzo, V.M. & Iannitti, T. (2017). Cerebrolysin reduces mechanical allodynia in a rodent model of peripheral inflammation. *Neuroscience letters*, **642**, 27-30.
- Morales-Medina, J.C.,** Flores, G., Vallelunga, A., Griffiths, N.H. & Iannitti, T. (2019). Cerebrolysin improves peripheral inflammatory pain: Sex differences in two models of acute and chronic mechanical hypersensitivity. *Drug Dev Res*.
- Moriarty, O.,** Roche, M., McGuire, B.E. & Finn, D.P. (2012) Validation of an air-puff passive-avoidance paradigm for assessment of aversive learning and memory in rat models of chronic pain. *J Neurosci Methods* 204, 1–8.
- Morris, Richard** (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11 (1): 47-60.
- Muzzio, I.A.,** Kentros, C., and Kandel, E.R. (2009a). What is remembered? Role of attention on the encoding and retrieval of hippocampal representations. *J. Physiol.* 587, 2837–2854.
- Muzzio, I.A.,** et al. (2009b). Attention enhances the retrieval and stability of visuospatial and olfactory representations in the dorsal hippocampus. *PLoS Biol.* 7
- Olton, D. S.,** Becker, J. T., & Handelmann, G. E. (1979). Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(03), 313–322.
- Penfield, W., & Milner, B.** (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 79, 475–497.
- Redmond, A. M.,** et al. (1994). Effect of paroxetine and fluvoxamine on behavioural changes in a number of paradigms in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *J. Serotonin Res.* 1: 199-205.
- Rex, A.,** Voigt, J-P, Gustedt, C. Beckett, Simon. Fink, H. (2004) Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague–Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177: 23–34
- Scoville, W.B., & Milner, B.** (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.
- Seltzer, Z.,** Dubner, R. & Shir, Y. (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, **43**, 205-218.

- Shi, M., Wang, J.-Y., Luo, F. (2010).** Depression shows divergent effects on evoked and spontaneous pain behaviors in rats. *J. Pain*, 2010 Jan 20.
- Song, C., Leonard, B.E., (2005).** The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.*;29(4-5):627-47. Epub 2005 Apr 25.
- Stockert, M., Serra, J. and de Roberts, E. (1988).** Effect of olfactory bulbectomy and chronic amitryptiline treatment in rats. 3H-imipramine binding and behavioral analysis by swimming and open field tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 681686.
- Switzer, R. C., DeOlmos, J. and Heimer, L. (1985)** The olfactory system. In: *The Rat Nervous System*, pp. 1-36, Paxinos, G. (ed.) Academic Press, Sydney.
- Van Rijzingen, I. M. S., Gipsen, W. H. and Spruijt, B. M. (1995)** Olfactory bulbectomy temporarily impairs Morris maze performance: an ACTH (4-9) analog accelerates return of function. *Physiol. Behav.* 58: 147-152.
- Van Rijzingen, Willem Hendrik Gipsen, Berry M. Spruijt. (1994).** Olfactory Bulbectomy Temporarily Impairs Morris Maze Performance: An ACTH(4-9) analog Accelerates Return of Function. *Physiology & Behavior*, Vol. 58, No. 1, pp. 147-152,
- Van Riezen, H. and Leonard, B. E. (1990)** Effects of psychotropic drugs on the behaviour and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol. Ther.* 47: 21-34.
- Wackermannová M, Pinc L, Jebavý L.** Olfactory sensitivity in mammalian species. *Physiol Res.* 2016 Jul 18;65(3):369-90.
- Wang, W., Qi, W.J., Xu, Y., Wang, J.Y. & Luo, F. (2010)** The differential effects of depression on evoked and spontaneous pain behaviors in olfactory bulbectomized rats. *Neuroscience letters*, **472**, 143-147.
- Yamamoto T, Jin J, Watanabe S (1997).** Characteristics of memory dysfunction in olfactory bulbectomized rats and the effects of cholinergic drugs. *Behav Brain Res* 83:57–62.

12.0 ANEXOS

El presente Proyecto de tesis de maestría fue presentado en el LXII Congreso nacional de la sociedad mexicana de ciencias fisiológicas, A.C. del 11 al 15 de agosto del 2019 en la Ciudad de Querétaro, Qro.



Respuesta conductual nociceptiva, locomotora y memoria espacial en rata con bulbectomía Olfatoria

Galindo-Paredes, Gumaro^{1,2} (estudiante de posgrado) y Morales-Medina, Julio Cesar²

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV.

²Centro de Investigación en reproducción animal, CINVESTAV-UAT.

El olfato permite a la mayoría de los mamíferos detectar y discriminar odorantes y feromonas que influyen en varias funciones fisiológicas. Los bulbos olfatorios (BO) son una prolongación bilateral del telencéfalo rostral y son una puerta de entrada sensorial importante a regiones corticales y subcorticales. La bulbectomía olfatoria (OBX) en rata produce disfunción en el circuito corteza-hipocampo-amígdala que induce cambios conductuales. Estudios previos con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD) presentaron deterioro en el aprendizaje-memoria espacial (AE-ME) usando el laberinto acuático de Morris (LAM), hiperlocomoción en la prueba de campo abierto (PCA) e incremento en la alodinia mecánica (AM) usando los filamentos de Von Frey y térmica (AT) en la prueba de la acetona. Los estudios se realizaron 15 días postcirugía y usaron el mismo grupo experimental en todas las pruebas. Sin embargo, no se ha analizado el aprendizaje inhibitorio (AI) y memoria reversa (MR) en el LAM, y la conducta nociceptiva en ratas macho Wistar (RMW) en grupos experimentales independientes; 30 días postcirugía. Evaluamos la respuesta conductual nociceptiva, locomotora, ME y MR en RMW con OBX formando 3 grupos independientes. En el primer y segundo grupo se evaluó el AE-ME, AI y MR en el LAM y la locomoción en la PCA, 4 semanas postcirugía. En el tercer grupo se evaluó la AM y AT pre- y postcirugía 5 veces en total. En la rata OBX, los resultados indican mayor latencia para encontrar la plataforma de escape en el AE y AI y menor número de cruzamientos en las 2 pruebas de sonda en ME y MR. El número de retirada de las extremidades incremento en el AT, sin cambios en la prueba de AM. Las ratas OBX tuvieron mayor locomoción con respecto al grupo control. Concluimos que la remoción de los BO induce una serie de respuestas conductuales alteradas debido a la conexión íntima con regiones que modulan la nocicepción, la novedad y el aprendizaje y memoria.