



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE LA CAPACIDAD
OLFATORIA EN RATONES

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

IBQ. María Estefanía Guerrero Gómez

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. RODRIGO ERICK ESCARTÍN PÉREZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Juriquilla, QRO. (AGOSTO) 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
Abreviaturas	7
Resumen	9
Abstract	11
Antecedentes	13
Sistema olfatorio	13
Epitelio olfatorio	14
Bulbo olfatorio	21
Corteza olfatoria	23
Alteraciones olfatorias	25
Prolactina	26
Regulación de la secreción de prolactina por la dopamina	29
Regulación electrofisiológica de la secreción de prolactina	30
Prolactina en machos y bulbo olfatorio	30
Justificación	36
Hipótesis	37
Objetivo General	37
Objetivos particulares	38
Metodología	38
Animales	38
Tratamientos	39
<i>Prolactina</i>	39
<i>Sulpirida</i>	39
<i>Cuantificación de mRNA de Prl y del Prlr en hipófisis</i>	40
Diseño experimental	41
Experimento 1	42
Experimento 2	42
Pruebas olfatorias	43
Prueba de alimento escondido (PAE)	44
Prueba de preferencia sexual olfatoria (POT)	44
Prueba de habituación-deshabituación olfatoria (PHD)	46
Evaluación de efectos secundarios generados por el tratamiento	48
Evaluación de la actividad locomotora espontánea	48
Análisis de resultados	49
Resultados	49

Experimento 1	49
<i>Evaluación de la capacidad olfatoria en un modelo de hiperprolactinemia inducida farmacológicamente con sulpirida o por la inyección sistémica de la hormona PRL</i>	49
<i>Detección olfatoria con la prueba de alimento escondido en los distintos periodos de evaluación de los tratamientos para generar hiperprolactinemia</i>	52
<i>Preferencia sexual olfatoria en los distintos periodos de evaluación de los tratamientos para generar hiperprolactinemia</i>	53
<i>Habitación y discriminación olfatoria evaluada mediante la prueba de habitación-deshabitación olfatoria en los distintos periodos de evaluación del tratamiento para generar hiperprolactinemia</i>	55
<i>Animales hiperprolactinémicos no presentan cambios en su peso</i>	57
<i>Una hiperprolactinemia generada farmacológicamente modifica el consumo alimenticio de los animales</i>	60
Experimento 2	61
<i>La detección olfatoria en ratones macho se mantiene en un estado de hiperprolactinemia</i>	61
<i>Animales tratados con sulpirida no muestran preferencia al olor de una hembra receptiva tras una semana de haber finalizado el tratamiento</i>	63
<i>El patrón de habitación-deshabitación olfatoria se modifica independientemente del tratamiento mostrando una consistente disminución en el tiempo de olfacción</i>	65
<i>La capacidad motora de ratones tratados con sulpirida por 14 días no se ve afectada</i>	73
<i>Animales tratados con sulpirida presentan variaciones de peso y consumo de alimento tras haber finalizado los tratamientos</i>	75
Discusión	78
Conclusiones	87
Bibliografía	88

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1 Composición celular de la mucosa olfatoria.	16
Fig. 2 El reconocimiento del olor es de forma combinatoria.	19
Fig. 3 Esquema de la transducción de la señal olfatoria.....	20
Fig. 4 Esquema representativo de las diferentes capas y células que se pueden identificar en el bulbo olfatorio.	23
Fig. 5 Sistema olfatorio en mamíferos.	25
Fig. 6 Caracterización del número y afinidad de los sitios de unión a PRL en diferentes regiones del cerebro y riñón.....	33
Fig. 7 El PRLR se expresa en el epitelio olfatorio y capa mitral del bulbo olfatorio.....	34
Fig. 8 Expresión del PRLR en el epitelio olfatorio en el ratón PRLR-IRES-CRE.	35
Fig. 9 Curva dosis-respuesta de sulpirida sobre la expresión relativa del mRNA de <i>Prl</i> y <i>Prlr</i>	41
Fig. 10 Esquema ilustrativo del diseño experimental para los experimentos 1 y 2.	43
Fig. 11 Representación que muestra una de las configuraciones de organización de los estímulos olfatorios en la prueba de preferencia sexual olfatoria.....	46
Fig. 12 Respuesta conductual en la prueba de alimento escondido previo al tratamiento.....	50
Fig. 13 Preferencia sexual olfatoria previo al tratamiento.	51
Fig. 14 Pruebas de habituación- deshabituación olfatorias previas al tratamiento.	52
Fig. 15 Peso de animales tratados por 14 días ya sea con PRL o sulpirida para generar hiperprolactinemia.	59
Fig. 16 Consumo de alimento de animales tratados con PRL y sulpirida durante 14 días para generar hiperprolactinemia.....	61
Fig. 17 Detección olfatoria en animales tratados con sulpirida.	62
Fig. 18 Preferencia sexual olfatoria en animales tratados con sulpirida.	64
Fig. 19 Patrón de conducta en la prueba habituación-deshabituación en ratones macho tratados con sulpirida.....	66
Fig. 20 Prueba de habituación-deshabituación en ratones macho tratados con sulpirida.....	68
Fig. 21 Patrón conductual en animales tratados con sulpirida no está influenciado por el número de exposiciones al mismo odorante.....	70
Fig. 22 El desempeño olfatorio en animales tratados con sulpirida no está influenciado por el número de exposiciones al mismo olor.	72
Fig. 23 Distancia total recorrida en animales tratados con sulpirida por 14 días.	74
Fig. 24 Efecto del tratamiento de sulpirida sobre el peso de los animales.....	76
Fig. 25 Consumo de alimento en cada uno de los periodos de evaluación.....	77
Tabla 1. Latencia para descubrir el alimento de manera visible	53
Tabla 2. Latencia para descubrir el alimento cuando este se encuentra oculto ..	53
Tabla 3. Preferencia sexual olfatoria en los distintos tratamientos para inducir hiperprolactinemia.....	55
Tabla 4. Prueba de habituación deshabituación olfatoria en los distintos tratamientos para generar hiperprolactinemia	56

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de maestría se realizó en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán y la Dra. Rebeca Corona García-Cabral.

En el curso de la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos de la Dirección General de Estudios de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA- UNAM-PAPIIT-IA202218, IA200820, IN204718) y del donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT A1S8948). Asimismo, la beca para el desarrollo de este trabajo fue otorgada por el CONACYT (becario:797681).

El comité tutor estuvo integrado por:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dra. Rebeca Corona García-Cabral

Dra. Yazmín Macotella Guzmán

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Agradecemos el apoyo técnico brindado por el personal del INB:

Técnico Académico del Laboratorio D-05:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

Bioterio:

Dra. María Antonieta Carbajo Mata

Dra. Alejandra Castilla León

MVZ. José Martín García Servín

Unidad de Enseñanza:

Dra. Nuri Aranda López

M. en C. Leonor Casanova Rico

Integrantes del Laboratorio D-05:

Biol. Luis Ángel Morales Laubarruquio

Biol. Viridiana Cervantes Bueno

Dra. Preethi Jayakumar

M. en C. Julio Daniel Reyes Mendoza

IBT. Daniel Muñoz Mayorga

Colaboraciones:

Dra. Preethi Jayakumar

Dra. Verónica Rodríguez Córdoba, Biol. Soledad Mendoza

ES FACIL "CREERSE EL CUENTO" CUANDO NO TIENES LA EVIDENCIA DE TU FRACASO

GOLPEANDOTE EN LA CARA TODOS LOS DÍAS

Abreviaturas

ACIII Adenilato ciclasa III

AE Alimento Escondido

BO Bulbo Olfatorio

cAMP Monofosfato de Adenosina Cíclico

cDNA DNA complementario

CG Capa Granular

CGL Capa Glomerular

CM Capa Mitral

CNGC Canales Activados por Nucleótidos Cíclicos

CNO Capa del nervio olfatorio

CO Corteza olfatoria

DA Dopamina

EO Epitelio Olfatorio

EPL Capa Plexiforme Externa

GDP Guanosín Difosfato

gl Glomérulos

GPCR *G-Protein Coupled Receptor*

GrC Células Granulares

GTP Guanosín Trifosfato

IPL Capa Plexiforme Interna

IRES Sitio Interno de Entrada al Ribosoma

ITI Periodo inter-estímulo

LOT Lateral Olfactory Tract

M/TC Células mitrales/empenachadas

MAPK Proteína cinasa activada por mitógeno

MC Células Mitrales

mRNA RNA mensajero

NO Nervio Olfatorio

NSO Neuronas Sensoriales Olfatorias

OBP Odorant Binding Protein

OMP Proteína Marcadora Olfatoria

PG Periglomerular

PGC Células Periglomerulares

PHD Prueba de habituación-deshabitación

PI3K Fosfatidilinositol 3 cinasa

POT Preferencia Sexual Olfatoria, preference olfactory test

PRL Prolactina

PRLR Receptor de prolactina

qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction

RO Receptor Olfatorio

s.c. Subcutáneo

STAT Signal Transducer and Activator of Transcription

TC Células empenachadas

TIDA Neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares

Resumen

La olfacción influencia el despliegue de variadas conductas de las cuales dependemos para interactuar con el entorno, incidiendo en la detección de fuentes de alimento y potenciales peligros. En consecuencia, cualquier alteración en el funcionamiento olfatorio repercute en diferente grado en dicha interacción.

El bulbo olfatorio es la primera estructura cerebral responsable de comunicar la información olfatoria a distintas regiones cerebrales centrales para que se genere una respuesta. El procesamiento de la información olfatoria comienza con la detección del estímulo olfatorio, el cual se lleva a cabo en el epitelio olfatorio, y está muy influenciado por la respiración repercutiendo de manera muy importante en la percepción del entorno. Una vez detectada la información, ésta es codificada y filtrada en el bulbo olfatorio, el cual es el primer relevo cortical en el sistema nervioso central y concentra diferentes tipos de células, tales como las células mitrales y empenachadas, responsables de la transmisión directa de la información a regiones de la corteza olfatoria primaria, como la corteza piriforme, estructura responsable de la interpretación de la información olfatoria. La interpretación a su vez dependerá de la interacción con otras regiones cerebrales, la integridad de comunicación del circuito y la modulación tanto de fibras centrífugas como de hormonas.

A la fecha hay escasos estudios de la modulación hormonal sobre la función olfatoria. La prolactina es una de las hormonas que se sabe influye en la función olfatoria, participando en el proceso de neurogénesis en el bulbo olfatorio incidiendo directamente en conductas de contexto social, tales como conductas parentales y reproductivas. Sin embargo, poco se conoce de su participación en contextos distintos a los anteriores. La mayoría de los estudios de la participación de la prolactina se han realizado en hembras, esto debido a la relevancia que tiene en el embarazo y la lactancia, poco se sabe sobre su participación en machos más allá de un contexto no social. El estudio de la prolactina en machos está asociado principalmente a cuestiones patológicas, tales como la hiperprolactinemia. La hiperprolactinemia en machos es referida cuando hay elevaciones de la hormona prolactina superiores al nivel fisiológico normal. La mayoría de los estudios realizados en machos están asociados a la función reproductiva.

En el presente trabajo se usó una batería de pruebas conductuales para evaluar la función olfatoria general de ratones macho bajo un estado de hiperprolactinemia. Esta batería de pruebas conductuales consta de una prueba de detección (alimento escondido), identificación de estímulos fisiológicamente relevantes (preferencia sexual olfatoria) y una prueba de memoria y discriminación olfatoria (prueba de habituación/deshabituación). Estas pruebas nos permitieron evaluar la capacidad para detectar, identificar, reconocer y discriminar olores. Dado a que es de interés para el estudio conocer los efectos sobre la función del bulbo olfatorio principal, se empleó solo el contenido volátil de cada uno de los estímulos.

Para la generación del estado hiperprolactinémico, se empleó como estrategia experimental la inyección subcutánea de la hormona prolactina o el antagonista para los receptores D2, sulpirida. La sulpirida es un fármaco que inhibe la acción de la DA sobre las neuronas TIDA promoviendo así la secreción de prolactina. Tras realizar evaluaciones antes, durante y después de haber finalizado el tratamiento no se observaron alteraciones en la detección ni en la discriminación olfatoria, pero sí en la preferencia sexual olfatoria, observándose un efecto después de finalizado el tratamiento.

Lo anterior indica que la función de regiones cerebrales centrales relevantes para el procesamiento olfatorio de estímulos no etológicamente relevantes no está afectado, sin embargo, la hiperprolactinemia sí afecta el procesamiento de estímulos etológicamente relevantes dado que en la prueba de preferencia sexual olfatoria los animales pierden preferencia hacia el estímulo de hembra.

Abstract

Olfaction influences the display of different behaviors that depend on the interaction with the environment as it has a role on the detection of sources of food and potential dangers. Consequently, any disturbance on the olfactory function influences this interaction.

The olfactory bulb is the first brain structure responsible for the communication of the olfactory information to different central brain regions to produce a response. The processing of olfactory information starts with the detection of the olfactory stimuli which is carried out in the olfactory epithelium. This process is highly influenced by breathing hence having a significant impact on the perception of the environment. Once the olfactory information is detected, it is encoded and filtered within the olfactory bulb by its different types of cells, such as the mitral and tufted cells. These cells are responsible for the direct transmission of the information to the primary olfactory cortex regions, like the piriform cortex, which is responsible for the processing of the olfactory information. The interpretation of the olfactory information, in turn, depends on the interaction with other brain regions, as well as the integrity of the communication of the circuit and the modulation of both, centrifugal fibers and hormones.

To date, there are few studies that address the hormonal modulation on olfactory function. Prolactin is a hormone known to influence the olfactory function, participating in the olfactory bulb neurogenesis, and directly modulate social context behaviors, such as parental and reproductive behaviors. However, little is known about its participation in other contexts. Most of the studies about the role of prolactin on olfaction, have been carried out in females, due to the relevance of this hormone in pregnancy and lactation, therefore, little is known about its participation in males beyond a non-social context. The study of prolactin in males is mainly associated to pathological impairments, such as hyperprolactinemia. Hyperprolactinemia in males is diagnosed when prolactin plasma concentration is greater than normal physiological levels. As such, most of the studies carried out in males are associated with reproductive function.

In the present work, we used a battery of behavioral tests to evaluate the general olfactory function of male mice under hyperprolactinemia. This battery consisted

of a detection test (food seeking test), identification of physiologically relevant stimuli test (olfactory preference test) and a memory and discrimination olfactory test (test of habituation/dishabituation). These tests allowed us to evaluate the detection, identification, recognition and discrimination odor capacity. Given that it is of interest for the study to know the effects on the function of the main olfactory bulb, only the volatile content of each of the stimuli was used.

To induce hyperprolactinemia, we performed subcutaneous injections of prolactin or sulpiride, an antagonist for D2 receptors, as an experimental strategy. Sulpiride is a drug that inhibits the action of DA on TIDA neurons, thus promoting prolactin secretion. After carrying out performance evaluations before, during and after having finished the treatment, no alterations on detection or discrimination were observed, but the sexual preference was affected after the treatment.

Taken together, these results indicate that the functioning of relevant central brain regions for non-ethologically relevant stimuli olfactory processing is not affected by hyperprolactinemia, however this hormonal alteration does affect the processing of ethologically relevant stimuli since hyperprolactinemic animals lose preference towards female cues.

Antecedentes

Sistema olfatorio

La olfacción tiene un rol muy importante en nuestra interacción con el ambiente (*Huart et al., 2013*), cumpliendo un papel crucial en la vida de animales y humanos e influenciando actividades vitales como la alimentación, la reproducción y las conductas sociales (*Brai & Alberi, 2018; Fernández et al., 2018a; Soria-Gomez et al., 2014*). Las señales generadas por situaciones importantes pueden ser bastante similares a las de fenómenos sin importancia, por lo que requieren un análisis cuidadoso de los patrones de entrada sensorial para distinguirlos. Ciertos aspectos de las señales externas generalmente están sobrerrepresentados y otros están sub-representados de acuerdo con los intereses del organismo, es decir, la percepción olfatoria puede verse modificada por la memoria, la motivación y la información de otras modalidades sensoriales, pero no habrá información aferente adicional que no sea la transducida originalmente (*Cleland, 2014; Courtiol & Wilson, 2017*).

El sentido del olfato no sólo es importante para la detección de peligros potenciales sino también para la búsqueda, el disfrute y el consumo alimenticio (*Walliczek-Dworschak & Hummel, 2017*). Además, la percepción de un olor está influenciada por un componente emocional (*Fernández et al., 2018b*).

Los estímulos olfatorios pueden provocar diferentes respuestas emocionales dependiendo de la asociación inicial del olor a un determinado evento, y así desencadenar respuestas teniendo en cuenta la memoria (*Walliczek-Dworschak & Hummel, 2017*). De acuerdo con esto, los olores evocan recuerdos (*Brai & Alberi, 2018; Walliczek-Dworschak & Hummel, 2017*) y por ello personas con pérdida del olfato pueden sentirse socialmente aisladas o inseguras (*Fernández et al., 2018a*). Otros problemas del olfato están relacionados con la higiene personal, al ser incapaces de percibir su propio aroma. Debido a lo anterior, los sujetos con problemas de percepción olfatoria pueden perder calidad de vida, incluso llegar a desarrollar problemas psicológicos (*Croy et al., 2014; Frasnelli & Hummel, 2005; Miwa et al., 2001*).

En mamíferos, el sistema olfatorio principal está conformado por tres niveles: el epitelio olfatorio (EO), el bulbo olfatorio (BO) y sus proyecciones hacia la corteza olfatoria (CO) (*Brai & Alberi, 2018; DeMaria & Ngai, 2010*). De estas estructuras,

el EO provee de acceso directo al ambiente externo sin pasar a través de la barrera hematoencefálica representando un acceso viable y no invasivo a este sistema (*Brai & Alberi, 2018*). A nivel de EO se lleva a cabo la detección de los odorantes, los cuales contactan con las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) de manera dependiente de la actividad respiratoria y el influjo de aire en las narinas (*Buonviso et al., 2003; DeMaria & Ngai, 2010; Kay et al., 2009; Kay, 2014; Mori, 2016*). La información detectada en este nivel se transforma en potenciales de acción y es transmitida a través de su axón hacia la primera estructura de relevo sensorial en el sistema nervioso central (SNC), el BO, donde se lleva a cabo la codificación y filtraje de la información olfatoria proveniente de las NSO y que envía a axones a la CO (*Brai & Alberi, 2018; Kay, 2014; Kay et al., 2009; Mori, 2016*). Son diversas las funciones que el sentido del olfato puede modular, esto se basa sobre la conectividad directa del tracto olfatorio lateral a la corteza piriforme, corteza entorrinal, hipocampo y amígdala regulando la percepción olfatoria innata y adquirida, memoria, miedo y estado de alerta (*Brai & Alberi, 2018; Courtiol & Wilson, 2017; Fernández et al., 2018b; Mori, 2016*).

Epitelio olfatorio

El EO consta de dos capas: la mucosa olfatoria y la lámina propia (*Imamura & Hasegawa-Ishii, 2016*). En el EO podemos ubicar tres diferentes áreas: la apical, la intermedia y la basal, en donde pueden identificarse al menos seis clases de células principales. El EO contiene de 10 a 20 millones de NSO bipolares intercaladas con células de sostén, células con microvellosidades, células basales globosas y horizontales, así como las glándulas de Bowman (*Barnett & Chang, 2004*).

En la parte apical del EO podemos localizar a las células de sostén y células con microvellosidades. Las células de sostén del EO se encuentran rodeando a las NSO (*Brai & Alberi, 2018*). Estas células regulan y mantienen el medio iónico apropiado para que la transducción de la señal olfatoria se lleve a cabo, y, junto con el moco, contribuyen en la remoción de moléculas odorantes y sustancias tóxicas. Las células de sostén son además las células que proveen de apoyo trófico, metabólico y mecánico a las NSO (*Imamura & Hasegawa-Ishii, 2016*), las cuales podemos localizar en la parte intermedia del EO. Las NSO tienen una dendrita corta que termina en la llamada vesícula olfatoria que proyecta a la

cavidad nasal donde termina en un cono que contiene de 10 a 20 cilios. Estos cilios se localizan en la parte apical y están en contacto directo con el ambiente. Los cilios son procesos desmielinizados de aproximadamente 2 μm de longitud y 0.1 μm de diámetro que contienen receptores específicos a odorantes. En el otro extremo, cada NSO tiene un solo axón que proyecta desde la parte basal del EO al BO atravesando por la lámina criboide del hueso etmoides. Además de ser capaces de detectar estímulos químicos, las NSO también detectan estímulos mecánicos (*Grosmaître et al., 2007; Mori, 2016*). Otra característica relevante de las NSO es su recambio continuo a lo largo de la vida adulta (*Imamura & Hasegawa-Ishii, 2016*). Se han sugerido transiciones entre 4 semanas y 12 meses en ratones según la magnitud y el grado de los desafíos del entorno circundante.

Las células madre están situadas en la parte basal del EO cerca de la lámina propia (*Brai & Alberi, 2018*). En su conjunto estas células consisten en células basales globosas y células basales horizontales, mismas que participan en el recambio celular normal en el EO y pueden permitir la regeneración de componentes dañados. Las células basales horizontales, raramente proliferan *in vivo*, se encuentran directamente unidas a la lámina basal y son las precursoras directas de casi todos los tipos celulares del EO, excepto de las neuronas, de donde son precursores indirectos. Para la generación de nuevas NSO, las células basales horizontales se diferencian a células basales globosas, las cuales proliferan más a menudo, y estas, a su vez, en NSO. Continúa al EO se ubica la lámina propia. Aquí es donde los axones desmielinizados de las NSO son unidos en pequeños haces nerviosos para formar el nervio olfatorio (NO). Dentro de estos haces nerviosos están presentes un conjunto de células gliales especializadas, llamadas *olfactory ensheathing cells*, cuya función es crear un ambiente propicio para el crecimiento axonal de las NSO (*Chen et al., 2014; Choi et al., 2008*). En la lámina propia también se localizan vasos sanguíneos y la glándula de Bowman. La glándula de Bowman se extiende en la cavidad nasal y es la principal fuente de moco, mismo que baña los cilios neuronales, brinda protección antimicrobiana de la vía aérea superior y proporciona un medio molecular e iónico adecuado para la detección de los odorantes. Además, la

glándula de Bowman expresa acuaporinas y canales iónicos, que contribuyen al flujo de agua y de iones dentro del lumen ductal (ver fig.1).

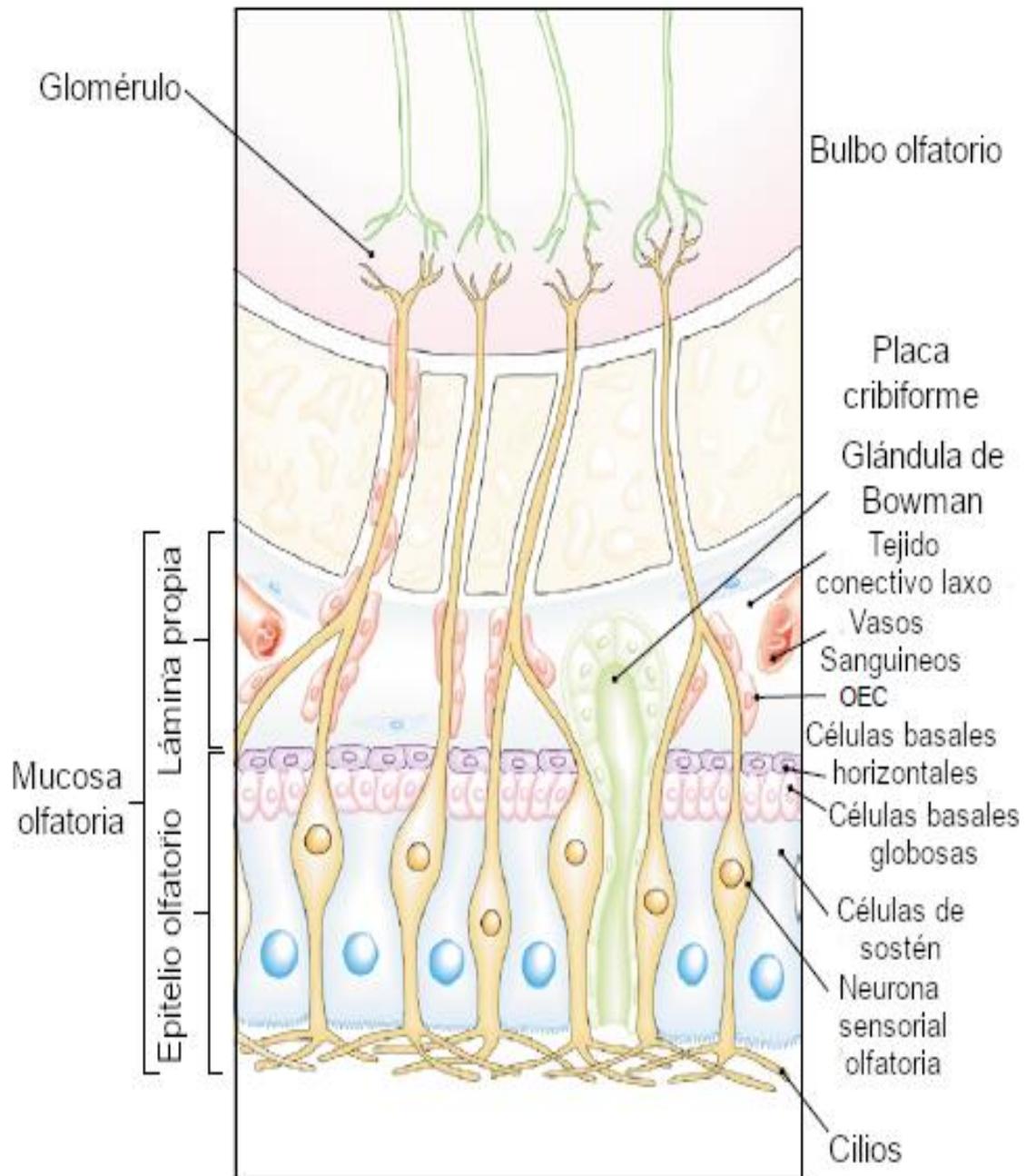


Fig. 1 Composición celular de la mucosa olfatoria. El epitelio olfatorio comprende la mucosa olfatoria y la lámina propia. El epitelio olfatorio contiene neuronas sensoriales olfatorias (que proyectan cilios en la cavidad nasal), células de sostén (tipo glía), células basales globosas, células basales horizontales y la glándula de Bowman. La lámina propia consiste en tejido conjuntivo laxo y células gliales olfatorias (olfactory ensheathing cells, OEC), que envuelven haces de receptores olfatorios que se extienden desde el epitelio olfatorio. Los axones del receptor olfatorio atraviesan la placa cribosa e ingresan al SNC para formar el nervio olfatorio que arriba al bulbo olfatorio, donde hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden en la capa glomerular. *Modificado de Barnett & Chang, (2004).*

La transducción olfatoria tiene lugar en los cilios de las NSO (*Antunes & Simoes de Souza, 2016; Brai & Alberi, 2018; Cleland, 2014*). Los cilios olfatorios son estructuras de nanotubos de pequeño volumen que están embebidos en la mucosa (*Antunes & Simoes de Souza, 2016*). Los odorantes difunden a través del moco en el EO (*Cleland, 2014*) y se unen a pequeñas proteínas globulares conocidas como *odorant binding proteins (OBPs)* antes de alcanzar al receptor olfatorio (RO) (*Cleland, 2014*). Las OBPs de mamíferos son lipocalinas solubles producidas en la mucosa nasal y en otros tejidos epiteliales de varias especies animales (*Macedo-Márquez et al., 2014*). Aparentemente, las OBPs mejoran la solubilidad de odorantes hidrofóbicos (*Macedo-Márquez et al., 2014*) y ayudan en la remoción de odorantes antes percibidos promoviendo así la liberación del receptor y favoreciendo nuevamente la detección de nuevos odorantes (*Archunan, 2018*). Otra contribución fisiológica de las OBPs es preservar la integridad del tejido epitelial bajo condiciones de estrés oxidativo removiendo compuestos tóxicos y, eventualmente, dirigiéndolos a vías de degradación apropiadas (*Archunan, 2018; Macedo-Márquez et al., 2014*).

Hay evidencia que muestra que los RO's trabajan como mecano-receptores (*Grosmaître et al., 2007*). Esta propiedad provoca una fuerte influencia de la detección en las respuestas de las NSO (*Lefèvre et al., 2016*).

En el proceso de transducción, la prioridad es principalmente maximizar la capacidad de recopilar información sobre el entorno (*Brai & Alberi, 2018; Cleland, 2014*). Cuando un odorante se une a su RO, este desencadena una cascada de señalización dentro de los cilios que despolariza las NSO y provoca un tren de potenciales de acción, la frecuencia de los cuales depende sistemáticamente de la intensidad de despolarización provocada por el odorante (*Cleland, 2014*). Se considera que estos trenes de disparo generalmente constituyen códigos de frecuencia simples que informan la intensidad de activación de la NSO correspondiente, además de que pueden verse moderadamente afectados por los procesos de adaptación intracelular que sirven para enfatizar los cambios transitorios en la intensidad de la activación, amplificando o disminuyendo la señal (*Cleland, 2014; Courtiol & Wilson, 2017*).

Hay cerca de 350 tipos distintos de RO's expresados en el humano, y aproximadamente de 1000-1200 en ratones y ratas (*Antunes & Simoes de*

Souza, 2016; Brai & Alberi, 2018). La dimensión y diversidad del repertorio de RO's facilita la detección y discriminación del vasto número de olores que se pueden encontrar en el ambiente. Lo anterior, además, se ve enriquecido por la variación genética natural que contribuye a diferencias perceptuales en humanos variando su percepción a olores específicos. Un olor puede ser perceptible, pero con un umbral de detección alterado, lo cual a su vez puede modificar la cualidad del olor. Por otra parte, la pérdida de RO's puede reflejarse en la alteración de respuestas conductuales o electrofisiológicas específicas a un olor (*Su et al., 2009*).

Canónicamente, solo un tipo de RO es expresado en una sola NSO (*Antunes & Simoes de Souza, 2016; Su et al., 2009*). Por lo tanto, la señalización de una NSO específica refleja la actividad de un RO específico, lo cual promueve a su vez la discriminación de varios olores distintos en sus características fisicoquímicas (*Sinding et al., 2017*). Los RO son miembros de la familia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR, G-protein coupled receptor) (*Antunes & Simoes de Souza, 2016; Malnic et al., 1999; Trinh & Storm, 2004*). Los RO son extremadamente diversos en su secuencia de aminoácidos, lo cual a su vez es consistente con su capacidad para reconocer una amplia diversidad de odorantes que varían en tamaño, estructura, grupo funcional y carga (*Sinding et al., 2017; Trinh & Storm, 2004*) (ver fig. 2).

Receptores Olfatorios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Descripción
Odorantes															
A 					●										rancio, agrio
B 		●				●									dulce, herbal
C 	●			●	●		●			●	●				rancio, agrio, húmedo
D 		●			●	●									violetas, dulce, leñoso
E 	●			●	●		●	●		●	●	●			rancio, agrio, repulsivo
F 				●	●		●			●					dulce, naranja, rosas
G 	●			●	●		●	●		●		●		●	aceitoso, queso
H 				●	●		●			●		●			floral, fresco, rosas

Fig. 2 El reconocimiento del olor es de forma combinatoria. En el recuadro del lado izquierdo se pueden observar las características estructurales y funcionales que poseen los odorantes, en la parte superior se diferencia por su color a los receptores olfatorios que reconocen distintas características de los odorantes denotándose con círculos que corresponden al color del receptor olfatorio que reconoce determinada característica del odorante en la parte central del recuadro y a la derecha se describe el olor característico del odorante. Modificado de Malnic *et al.* (1999).

La activación de los GPCR olfativos transduce las señales olfatorias extracelulares en una señal intracelular activando una proteína de tipo $G_{\alpha\text{olf}}$ heterotrimérica, la cual posee actividad GTPasa (Antunes & Simoes de Souza, 2016). En su estado basal, las proteínas G existen como un heterotrímero compuesto por tres distintas subunidades α , β , y γ . Cuando un ligando se une y activa el GPCR, el cambio resultante en la conformación del receptor dirige a un cambio conformacional en la proteína G, el cual resulta en la disociación de guanósín difosfato (GDP) de la subunidad α y la subsecuente unión de guanósín trifosfato (GTP). La inactivación de la proteína G ocurre cuando la unión GTP es hidrolizada a GDP, un proceso que puede ser acelerado por reguladores de proteínas G o proteínas activadoras de GTPasa (Antunes & Simoes de Souza, 2016).

El principal blanco de la proteína $G_{\alpha\text{olf}}$ es el adenilato ciclasa III (ACIII) que cataliza la conversión de ATP en monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). El incremento en la concentración intracelular de cAMP ($[\text{cAMP}]_i$) en los cilios

olfatorios causa la apertura de canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC, de sus siglas en inglés *cyclic nucleotide gated channels*), dirigiendo a un incremento en la concentración intracelular de cationes, principalmente la concentración de iones de calcio ($[Ca^{+2}]_i$), y la despolarización de la membrana ciliar. El aumento de la $[Ca^{+2}]_i$ abre canales de cloro activados por Ca^{+2} y promueve el influjo de iones cloruro (Cl^-) desde los cilios hacia el exterior de la célula, lo que amplifica la despolarización iniciada por la apertura de los CNGC (Dibattista et al., 2017). La elevada $[Ca^{+2}]_i$ es reducida por la expulsión de Ca^{+2} a través de la membrana plasmática por el intercambiador Na^+/Ca^{+2} , un intercambiador Na^+/Ca^{+2} dependiente de potasio y la ATPasa de la membrana plasmática (Kang & Koo, 2012; Stephan et al., 2012). Por otra parte, la proteína marcadora olfatoria (OMP, *olfactory marker protein*) facilita la actividad de estos intercambiadores permitiendo una rápida extrusión del Ca^{+2} . Por lo tanto, toda la información olfatoria disponible para el cerebro es transmitida a través de moléculas de señalización que acoplan el estímulo olfatorio a canales iónicos (ver fig. 3).

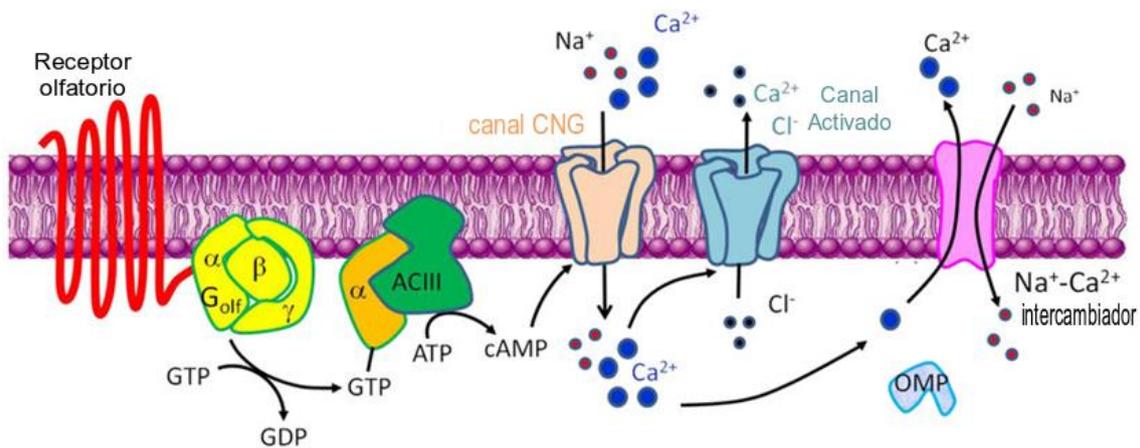


Fig. 3 Esquema de la transducción de la señal olfatoria. La transducción de la señal olfatoria comienza con la activación de un receptor olfatorio en la membrana de los cilios, esto dirige a un incremento en la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) a través de la activación de la adenilato ciclasa III (ACIII) por el acoplamiento de una proteína $G_{\alpha_{olf}}$. El incremento en la concentración de cAMP causa la apertura de canales activados por nucleótidos cíclicos, dirigiendo a un incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular y la despolarización de la membrana celular por el canal de Cl^- activado por Ca^{+2} . Entre las varias moléculas de la transducción de señales olfatorias, se sabe que el receptor olfatorio, la proteína marcadora olfatoria (OMP), la subunidad α de la proteína Golf ($G_{\alpha_{olf}}$) y ACIII son moléculas olfatorias específicas. Modificado de Kang & Koo, (2012).

Los mecanismos de terminación de la respuesta olfatoria después de la activación de GPCR's actúan, principalmente, para restaurar los niveles basales e intracelulares de segundos mensajeros, cAMP y Ca^{+2} (*Dibattista et al., 2017*).

Las NSO se adaptan después de una estimulación previa y un fuerte estímulo es necesario para generar la misma respuesta, respondiendo principalmente a cambios en el estímulo anteriormente presentado. Los mecanismos de adaptación remueven las señales de fondo y previenen la saturación, modulando el rango dinámico y contrarrestando la tasa de transmisión de la información. Segundos mensajeros, cAMP y Ca^{+2} , los cuales están involucrados en la traducción olfatoria, participan en diferentes tipos de adaptación (*Antunes & Simoes de Souza, 2016; Chaudhury et al., 2010*).

La adaptación rápida al olor se ve reflejado en una disminución en la respuesta a la presentación de un odorante, y esto ocurre unos pocos segundos después de un breve estímulo de acondicionamiento del olor y ocurre a nivel del CNGC. La adaptación lenta al olor es un proceso que tiene un tiempo de recuperación constante de minutos. En mamíferos, la adaptación lenta, es dada por breves pulsos repetitivos de olor presentados a 2 y 5 Hz mantenidos durante segundos que recuerdan un patrón de olfateo. La adaptación lenta al olor puede estar relacionada con la internalización de GPCR's mediada por la fosforilación catalizada por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y la cinasa 3 del receptor acoplado a la proteína G, también conocida como cinasa 2 del receptor β -adrenérgico (*Antunes & Simoes de Souza, 2016*).

Bulbo olfatorio

En el BO podemos ubicar radialmente las siguientes capas: capa del nervio olfatorio (CNO) (*Ford & Griff, 2017*), que es la capa más externa del BO y se compone por los axones amielínicos de las NSO. Las NSO que expresan un mismo receptor viajan de manera casi conjunta y coalescen en dos o tres glomérulos (gl) situados estereotípicamente en el BO (*Dibattista et al., 2017*). La capa glomerular (CGL), en la cual se pueden observar los gl's, que son estructuras globulares, donde establecen sinapsis las NSO con las células mitrales/empenachadas (M/TC) (*K. Kosaka & Kosaka, 2005*). Esta capa está poblada por una variedad de tipos celulares, esencialmente atribuible a tres clases principales de interneuronas locales: las células periglomerulares (PGC),

las más abundantes, son células inhibitorias mediadas principalmente por GABA/dopamina; las células de axón corto y las células empenachadas externas (Banerjee et al., 2015; Ford & Griff, 2017; Takahashi et al., 2016). Se estima que el 10%-16% de las neuronas en la CGL son dopaminérgicas (Björklund & Dunnett, 2007; T. Kosaka et al., 2019; Pignatelli & Belluzzi, 2017; Zhang et al., 2019), y aquí se incluyen, además de las PGC, una subpoblación de células empenachadas externas, las cuales a diferencia de las células empenachadas, no son neuronas de proyección (Pignatelli & Belluzzi, 2017). Le sigue la capa plexiforme externa (EPL) donde se ubican principalmente células empenachadas (TC) (K. Kosaka & Kosaka, 2005), la capa mitral (CM) donde se ubican las células mitrales (MC), que, junto con las TC, constituyen las células principales o de proyección del BO (Briffaud et al., 2012). La capa plexiforme interna (IPL) en la que se observan los axones de las MC y algunos procesos de las células granulares profundas (K. Kosaka & Kosaka, 2005; Nagayama et al., 2014), luego podemos ubicar a la capa granular (CG) donde se encuentran las células granulares (GrC), las cuales son carentes de axón e inhibitorias tipo GABA, y son las responsables de esculpir la actividad de la corteza olfatoria inhibiendo la actividad de las M/TC (Fukunaga et al., 2014; Yamaguchi, 2017). En esta capa también se encuentran axones primarios y colaterales de las M/TC, así como de fibras centrífugas (Brai & Alberi, 2018; D'Souza & Vijayaraghavan, 2014; Daulatzai, 2016; Eckmeier & Shea, 2014; Kawai et al., 2012; Linster, 2018; Zhan et al., 2013). El BO recibe aferencias de vías centrífugas neuromoduladoras: una vía noradrenérgica proveniente del *locus coeruleus*, una serotoninérgica proveniente del rafe dorsal y una colinérgica que desciende desde el cerebro basal anterior. Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, así como las de la sustancia nigra, principalmente, envían proyecciones directas a las capas EPL, CM y CG del BO (Zhang et al., 2019), modulando la actividad de la CO (Brai & Alberi, 2018; Höglinger et al., 2015; Pignatelli & Belluzzi, 2017) (ver fig. 4 y 5).

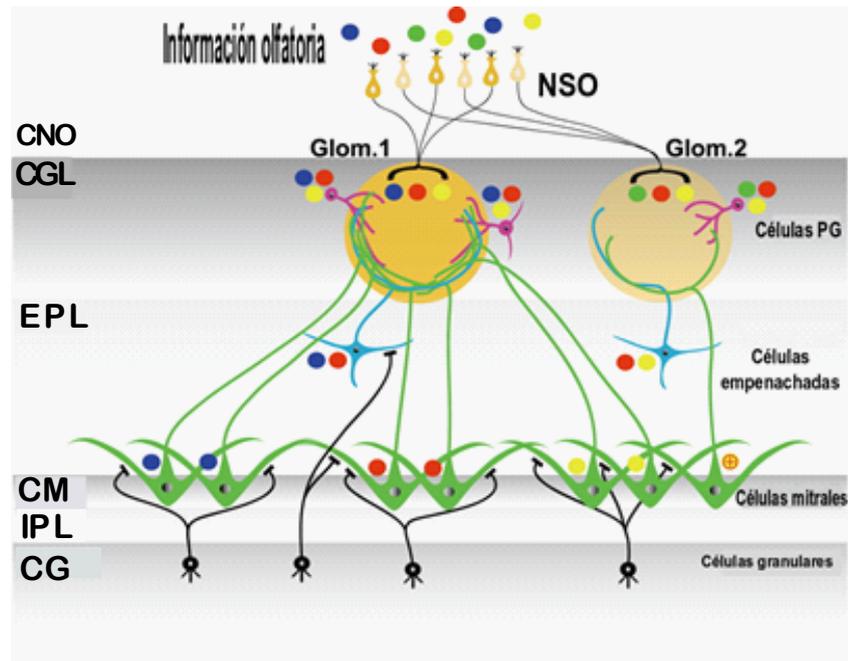


Fig. 4 Esquema representativo de las diferentes capas y células que se pueden identificar en el bulbo olfatorio. Los círculos de colores representan distintas moléculas olfatorias las cuales son procesadas selectivamente a través de las distintas capas y estructuras celulares que posee el bulbo olfatorio. Obsérvese como las células mitrales vecinas procesan el mismo odorante y además reciben el mismo control inhibitorio por parte de las células granulares. Mostrando que la especificidad olfatoria de las células mitrales depende de la localización de sus cuerpos celulares. Modificado de *Kikuta et al. (2013)*.

Corteza olfatoria

La organización anatómica y química de las entradas sensoriales del NO define un discreto mapa olfatorio en el BO, las cuales se transmiten más allá de las M/TC vía sinapsis axodendríticas. Las células principales (M/TC), las cuales constituyen la salida del BO a la corteza, son finamente sintonizadas a través de sinapsis dendrodendríticas, mayormente de interneuronas PGC y GrC (*Cavarretta et al., 2018*). Estas neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas son continuamente remplazadas en roedores (*Pignatelli & Belluzzi, 2017*) y humanos (*Alizadeh et al., 2015*), y son esenciales para la modulación de la tasa de disparos de las M/TC en la razón incremento/decremento de su actividad sincrónica de disparo en presencia y ausencia de estímulo olfatorio (*Cavarretta et al., 2018; Liu et al., 2019*).

Desde el BO, las proyecciones axonales de las M/TC, forman el tracto olfatorio lateral (LOT, por sus siglas en inglés *lateral olfactory tract*) e inerva áreas cerebrales superiores. Estas áreas comprenden diferentes estructuras cerebrales, las cuales se dividen principalmente en región olfatoria primaria y

secundaria. El área primaria, definida por todas aquellas regiones cerebrales que reciben información directa del BO (*Mori, 2016*), comprende a la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y la corteza entorrinal. Por su parte, las proyecciones procedentes de estructuras olfatorias primarias convergen en las regiones denominadas corteza olfatoria secundaria, que comprende la corteza orbitofrontal, la amígdala, el hipotálamo, la ínsula, el tálamo dorsomedial y el hipocampo. Generalmente, se ha asumido que la olfacción es independiente del tálamo, sin embargo, ahora se sabe que el núcleo dorsomedial del tálamo recibe entrada directa tanto de áreas olfatorias primarias tales como la corteza piriforme y áreas olfatorias secundarias (*Courtiol & Wilson, 2017*). La contribución del tálamo en las distintas tareas olfatorias dependerá de la demanda de estas para realizarse. Lo anterior es debido a que la actividad del BO es estado-dependiente, es decir, la actividad del BO no solo refleja la información olfatoria sino también el estado interno del animal y el de variables dependientes de tareas. La red olfatoria no es estática, puede cambiar en el curso de milisegundos, horas o días y dinámicamente reclutar diferentes áreas cerebrales para responder apropiadamente en el ambiente (ver fig.5).

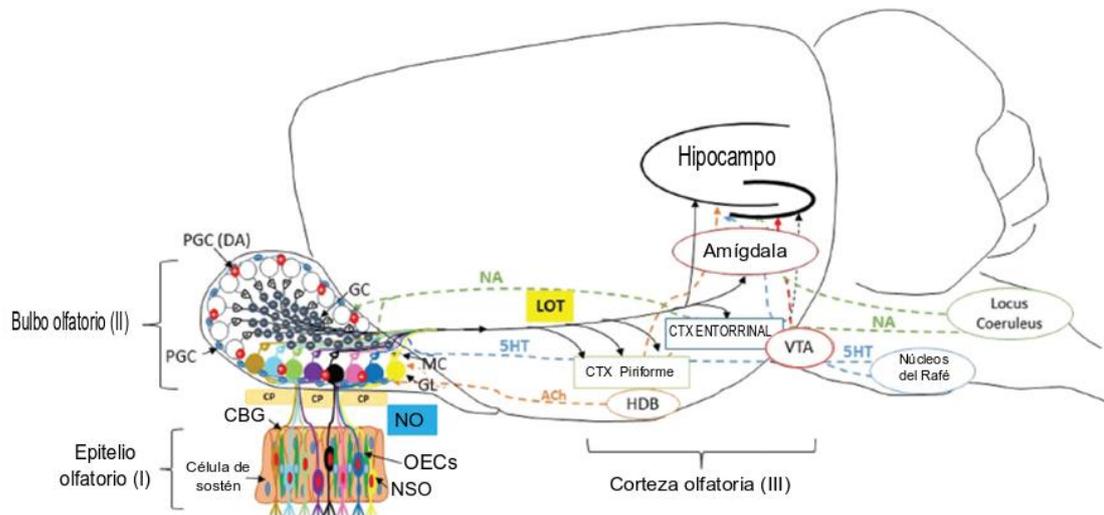


Fig. 5 Sistema olfatorio en mamíferos. Se señalan cada una de las áreas que participan en el procesamiento de la información olfatoria, sus proyecciones (representadas por líneas continuas) y las conexiones centrífugas (líneas punteadas). Se muestra el epitelio olfatorio y los principales tipos celulares que lo constituyen. Las neuronas sensoriales olfatorias (indicado por las siglas NSO) proyectan sus cilios hacia la cavidad nasal y sus axones hacia el cerebro para formar el nervio olfatorio (en la imagen remarcada en azul), pasando a través de pequeños agujeros en la placa cribosa (indicado por las siglas CP). En el bulbo olfatorio, las terminales del nervio olfatorio hacen sinapsis con las células mitrales excitatorias (carga positiva) y células empenachadas (no representada) en la capa glomerular. Las células periglomerulares (PGCs) dopaminérgicas y células granulares (CG) modulan la actividad de las células mitrales y empenachadas a través de sinapsis axodendríticas. Las proyecciones de las células mitrales se unen para formar el tracto olfatorio lateral (LOT, resaltado en amarillo) proyectando a la corteza piriforme, corteza entorrinal, amígdala e hipocampo, representando la corteza olfatoria. Las terminales colinérgicas (ACh, anaranjado) de la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB), eferencias serotoninérgicas (5-HT, azul) del núcleo del raphe y fibras noradrenérgicas (NA, verde) del *locus coeruleus* inervan el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria. Neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA, rojo) modulan la actividad de la corteza olfatoria. Tomado Brai & Alberi, (2018).

Alteraciones olfatorias

Las alteraciones olfatorias pueden ser clasificadas en periféricas, cuando se pierde la capacidad para detectar un odorante y centrales, cuando se altera la capacidad de recordar (memoria) un aroma e identificarlo (Brai & Alberi, 2018; Walliczek-Dworschak & Hummel, 2017). Cuando la lesión es periférica, el daño es a nivel de EO, cuando es central, el deterioro puede ser atribuido al BO o regiones cerebrales relacionadas con el procesamiento olfatorio, tales como estructuras corticales o del sistema límbico (Boesveldt et al., 2017). Pueden presentarse alteraciones del sistema olfatorio como: anosmia, carencia total del sentido del olfato, hiposmia, una reducida capacidad para oler, hiperosmia, una

percepción olfatoria incrementada, así como, parosmia, la cual se caracteriza por una distorsión del olor y fantosmia, percepción de un olor sin la presencia de una fuente que lo genere (*Boesveldt et al., 2017; Hummel et al., 2017*). Estas alteraciones pueden ser determinadas en un amplio espectro de desórdenes (*Brai & Alberi, 2018; Walliczek-Dworschak & Hummel, 2017*). También existen alteraciones transitorias dadas por situaciones hormonales especiales que ocurren principalmente en relación con distintas fases reproductivas, como son el estro, en roedores, el embarazo y la lactancia, en humanos (*Kass et al., 2017; Shingo et al., 2003; Sorokowski et al., 2019*).

Por otro lado, un estudio realizado en ratones muestra que la detección olfatoria es distinta en machos y en hembras presentando un dimorfismo en cuanto a la detección se refiere siendo superior en hembras que en machos (*Kass et al., 2017*), esto pudiera ser debido a una modulación hormonal de la periferia del sistema olfatorio. Las diferencias durante la presentación del estímulo se reflejan en mejoras del contraste entre representaciones de odorantes relacionados químicamente. Esto se revierte, al remover las hormonas sexuales circulantes tanto en hembras como en machos, observándose señales más lentas y menos discriminables sugiriendo una relación opuesta de las hormonas gonadales sobre la función olfatoria (*Kass et al., 2017*). Si bien en humanos se sugiere que las capacidades olfatorias son similares en hembras y en machos, *Sorokowski et al. (2019)*, empleando diferentes pruebas para evaluar la capacidad olfatoria (identificación, discriminación y umbral) muestra que la capacidad olfatoria en mujeres supera a la de los hombres, sin embargo, otros estudios discrepan en la superioridad olfatoria en mujeres respecto a hombres.

Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona sintetizada por las células lactotropas de la hipófisis anterior (*Bernard et al., 2019; Saleem et al., 2018*), cuyos niveles se elevan durante la lactancia y debe su nombre a la función de estimular a la glándula mamaria para la producción de leche (*Grattan, 2015; Saleem et al., 2018*).

Si bien la regulación inhibitoria de la secreción de PRL fue claramente demostrada en 1950 (*Grattan, 2015; Saleem et al., 2018*), fue tiempo después cuando se estableció a la dopamina (DA) como el principal factor responsable

para la inhibición de la síntesis y secreción de la PRL. Su secreción en la hipófisis anterior es inhibida por neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA), cuyos somas se encuentran en la parte dorsomedial del núcleo arcuato del hipotálamo y proyectan a la parte externa de la eminencia mediana secretando DA dentro de los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisario (*Saleem et al., 2018*), así, mediante la activación de los receptores D2 se produce un efecto inhibitorio en los lactotrofos (*Grattan, 2015; Gregerson, 2006; Saleem et al., 2018*). Los receptores D2 están conectados a una proteína G inhibiendo la estimulación de adenilato ciclasa y, por lo tanto, inhibiendo la producción de cAMP (*Maria, 2016*). Además, la secreción de PRL esta mediada indirectamente por la actividad de diversos neurotransmisores que actúan sobre la neuronas dopaminérgicas ya sea inhibiéndolas o estimulándolas, como lo son la serotonina, noradrenalina, histamina, galanina, somatostatina, colecistocinina, óxido nítrico, GABA, algunos péptidos opiáceos y los estrógenos promoviendo la secreción de la hormona, mientras que los factores que han sido asociados a la inhibición de la liberación de la hormona son la acetilcolina, la hormona liberadora de tirotropina, oxitocina, vasopresina, péptido intestinal vasoactivo, péptido activador de adenilato ciclasa hipofisario, angiotensina II, neurotensina, neuropéptido Y, calcitonina, péptidos similares a bombesina, péptido natriurético auricular y la PRL por si misma (*Bernard et al., 2019; Egli et al., 2010; Gregerson, 2006*). Lo anterior adquiere relevancia ya que recientemente se reportó la expresión del marcador de quimio-recepción del BO, OMP, en la glándula pituitaria. Se evidenció por estudios in vitro e in vivo que la OMP juega un papel importante en la producción y secreción de PRL inducida por la hormona liberadora de tirotropina, la cual esta mediada por la vía de señalización ERK1/2 y la concentración de calcio intracelular en los lactotrofos (*C. W. Kang et al., 2018*). Otro punto importante respecto a la actividad de la PRL es que su producción está restringida a la hipófisis (glándula pituitaria) en muchos animales, mientras en el humano, es producida también por numerosos sitios extrapituitarios como son los adipocitos, cerebro, glándula mamaria, linfocitos, próstata, cornea y retina, entre otros, donde es regulada por factores locales y predominantemente actúa como citosina.

De igual forma la regulación de la producción de PRL en humanos, es menos compleja, siendo la DA la que cumple predominantemente con el papel de factor de inhibición (*Egli et al., 2010*).

En la actualidad se le atribuyen más de 300 acciones biológicas distintas (*Grattan, 2015*), algunas de las cuales la involucran en la homeostasis iónica, osmoregulación, metabolismo, reproducción, angiogénesis, regulación del sistema inmunológico y del sistema nervioso, entre otras (*Ben-Jonathan et al., 2006; Bernard et al., 2019; Grattan, 2015; Gregerson, 2006*). Estas acciones biológicas de la PRL son mediadas vía endocrina, paracrina y autocrina (*Saleem et al., 2018*). La PRL tiene efectos pleiotrópicos, es decir, las funciones que pueden ser adaptativas en el estado de lactancia pueden ser incompatibles si los niveles de PRL están elevados inapropiadamente (*Grattan, 2015*). Los efectos tan diversos de la PRL tienen su explicación en su regulación transcripcional, en sus modificaciones post-transcripcionales, en la diversidad de sus receptores, e incluso en sus niveles circulantes (*Macotella et al., 2020; Saleem et al., 2018*).

El receptor de PRL (PRLR) es un miembro de la superfamilia de receptores de citosinas hematopoyéticas, la cual tiene alta homología estructural con la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario (*Saleem et al., 2018*). Se identifica por ser de alta afinidad, saturable y unido a la membrana, además de tener múltiples isoformas resultado del empalme alternativo a través del transcrito primario en varias especies y de la regulación transcripcional por promotores alternativos (*Saleem et al., 2018*). Las isoformas del PRLR difieren en tamaño y en la longitud de su dominio citoplasmático. Las isoformas pueden ser corta, intermedia o larga (*Gregerson, 2006; Kanyicska et al., 2000*). La principal isoforma del PRLR presente en humanos es la forma larga y esta, además de ser capaz de unirse a la PRL, también tiene afinidad al lactógeno placentario y a la hormona del crecimiento (*Bernard et al., 2019; Grattan, 2015; Gregerson, 2006b; Kanyicska et al., 2000; Saleem et al., 2018*).

El mecanismo clásico de activación de la vía de señalización de la PRL inicia al unirse a su receptor para la formación del complejo inactivo que consiste en una hormona y un receptor (*Kanyicska et al., 2000*). Esto es un prerequisite para que la PRL interactúe con el sitio de unión presente en otro PRLR formando un complejo trimérico (*Gregerson, 2006b; Kanyicska et al., 2000*). El dominio

intracelular es fundamental para el inicio de los mecanismos de transducción asociados con el PRLR (*Bernard et al., 2019; Saleem et al., 2018*). Las principales cascadas de señalización intracelular de la activación del PRLR implican a la vía JAK/STAT, fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK)3, la vía RAS-RAF-MAPK, la vía cinasas treonina/serina Nek3-Vav2-Rac1 y las cinasas de tirosina Src (*Bernard et al., 2019; Grattan, 2015; Gregerson, 2006b; Kanyicska et al., 2000; Saleem et al., 2018*). Dependiendo de la presencia o ausencia de ciertos elementos del dominio intracelular, se espera que las isoformas del PRLR exhiban diferentes propiedades de señalización (*Bernard et al., 2019*). La cinasa Janus 2 o JAK2 es la enzima que está constitutivamente asociada al PRLR (*Salais-López et al., 2018; Saleem et al., 2018*). La activación de las JAK ocurre por transfosforilación de tirosinas después de la oligomerización inducida por ligandos de los receptores de citosinas, que lleva a la unión de dos moléculas JAK (*Bernard et al., 2019; Saleem et al., 2018*). La activación de JAK2 por el PRLR, ocurre rápidamente después de la estimulación hormonal (*Kirk et al., 2019*). Cuando se activa, JAK2 fosforila los residuos de tirosinas en diferentes proteínas diana incluyendo a los del propio receptor y a una familia de proteínas transductoras llamadas STAT (por sus siglas en inglés, *signal transducer and activator of transcription*). Existen tres moléculas transductoras para el PRLR: STAT1, STAT3 y STAT5. De las tres isoformas que existen en el humano del PRLR y activan a JAK2, solo la isoforma corta no sufre fosforilación en sus residuos de tirosina. Las isoformas de los receptores de PRL se encuentran expresadas en casi todos los órganos y/o tejidos en diferentes concentraciones.

Regulación de la secreción de prolactina por la dopamina

La secreción de PRL es regulada en forma de retroalimentación negativa, y la PRL misma proporciona la señal aferente. La regulación de la PRL por las neuronas dopaminérgicas es mediada por múltiples mecanismos a lo largo del tiempo. El curso temporal de la acción de la PRL tiene un componente "rápido" de mayor actividad y un componente retrasado.

La acción rápida involucra dos componentes: un componente de bajo voltaje de corriente transitoria similar a potencial receptor, y un componente de alto voltaje

por inhibición de una corriente dependiente de Ca^{+2} (Lyons *et al.*, 2012). El componente más lento, con un curso temporal de minutos a horas, probablemente implica la fosforilación de serina inducida por PRL de la tirosina hidroxilasa que resulta en un aumento de la actividad enzimática. El componente retrasado de la acción de la PRL sobre las neuronas dopaminérgicas es probablemente a través de la expresión reducida de tirosina hidroxilasa.

Juntos, estos tres niveles de regulación proveen un fino control homeostático, con la PRL incrementando la tasa de disparo de estas neuronas para inducir un incremento en la secreción de dopamina y la rápida supresión de la secreción PRL de los lactotrofos. Al mismo tiempo, cambios más lentos y prolongados en la fosforilación de tirosina hidroxilasa y los eventos transcripcionales regulan la producción y secreción de dopamina en un curso de tiempo mucho más largo.

Regulación electrofisiológica de la secreción de prolactina

Las neuronas TIDA exhiben oscilaciones robustas entre estados hiperpolarizados y despolarizados, además, de disparos espontáneos durante la despolarización 'up-state' (Saleem *et al.*, 2018). Los patrones de disparo de estas neuronas de manera individual se ven reflejadas en el patrón de liberación de DA, esto sugiere que las neuronas actúan como una red sincrónica para liberar DA, ya sea de modo pulsátil o fásica (Egli *et al.*, 2010; Lyons *et al.*, 2012).

Los lactotrofos son las únicas células de la glándula pituitaria anterior que muestran actividad eléctrica espontánea en ausencia de estimulación hipotalámica. El influjo de Ca^{+2} a través de canales de calcio mediados por voltaje estimula la secreción de PRL lo que explica la secreción basal de PRL, y es consistente con un mecanismo regulador basado principalmente en la inhibición. La DA inhibe el influjo de Ca^{+2} generando una hiperpolarización de la membrana lo cual inhibe la secreción de PRL (Lyons *et al.*, 2012; Romanò *et al.*, 2013).

Prolactina en machos y bulbo olfatorio

La PRL es mejor conocida por sus funciones en hembras dado el papel clave en la fisiología materna, poco se conoce acerca del rol que cumple en machos, sin embargo, se ha asociado principalmente a la cuestión reproductiva (Egli *et al.*, 2010; Maria, 2016), respuesta al estrés (Levine & Muneyyirci-Delale, 2018), conducta paternal (Hashemian *et al.*, 2016; Mak & Weiss, 2010), neurogénesis,

la cual si bien se ha reportado ya en machos ha sido más explorada en hembras (*Mak & Weiss, 2010; Shingo et al., 2003*), metabolismo (*Macotela et al., 2020*) y cuestiones patológicas (*Bartke et al., 1987; Nonomura et al., 1985; Salais-López et al., 2018*). Una de las principales razones del sesgo en el estudio de la PRL en machos es debido al hecho de que en los modelos de roedores se detectan bajos niveles de PRL circulante en condiciones fisiológicas, reflejando un acceso limitado a la funcionalidad de la PRL en el cerebro (*Guillou et al., 2015; Salais-López et al., 2018*). Mediante la detección inmunohistoquímica de pSTAT5, se analizó la distribución de señalización derivada de PRL en el cerebro del ratón macho, suplementado con una dosis aguda de PRL de 5 mg/kg, en el cual se observa que la distribución está restringida a centros cerebrales que presentan expresión del PRLR, tales como, núcleos del hipotálamo preóptico, anterior y tuberal, así como en el núcleo septofimbrial o amígdala medial posterodorsal del telencéfalo. Tanto en humanos como en roedores, se sabe que la PRL está involucrada en la conducta sexual (*Egli et al., 2010*), principalmente. Por otra parte, en cuanto a la función reproductiva en machos se refiere, poco se conoce sobre las regiones exactas y los mecanismos a través de los cuales opera la PRL.

A nivel cerebral y conductual la PRL ha sido implicada en varias funciones, pero las que inciden sobre la función olfatoria son principalmente la conducta maternal, mediando la interacción madre-cría (*Larsen & Grattan, 2010*), paternal, conducta de apareamiento y la neurogénesis del BO. En cuanto a la conducta paternal se refiere, se ha reportado que el despliegue de esta conducta se asocia con niveles elevados de PRL, así como disminución de los niveles de testosterona después del nacimiento de las crías, promoviendo en los sujetos una mayor atención en las pistas relacionadas con el cuidado de sus crías (*Hashemian et al., 2016; Maria, 2016*). Dentro de las regiones cerebrales implicadas en el circuito que promueve la conducta paternal se encuentra el BO (*Hashemian et al., 2016*). En un estudio realizado en ratones macho por Mak y Weiss, (2010), se mostró que los padres eran capaces de reconocer a su camada aun cuando estos fueran adultos, si a los padres se le daba la oportunidad de interactuar con ellos cuando eran crías. Además, se mostró que este reconocimiento requiere neurogénesis en el BO y el hipocampo del

progenitor masculino, la cual es mediada por PRL. La PRL favorece el aumento de interneuronas en el BO a través de mediar la proliferación de estas células en la zona subventricular. Previamente, Shingo y colaboradores, (2003), reportaron en hembras preñadas que la neurogénesis en el BO promueve la generación de interneuronas, mismas que participan en la discriminación olfatoria y es crítica en varias conductas, siendo las periglomerulares las que más se observan. Esto es relevante tanto en la conducta maternal como paternal, ya que animales que carecen del PRLR no son capaces de discriminar entre sus crías y las de otra camada.

Se ha evidenciado que la PRL se expresa en varias regiones cerebrales, tales como el BO, tanto en distintas especies de anfibios (sapo, *Bufo arenarum Hensel*, rana, *Catesbeiana tadpoles* y salamandras) (Lüthy et al., 1985) como en mamíferos (Cabrera-Reyes et al., 2017; Freemark, 1996). En el estudio realizado por Lüthy y colaboradores, (1985), se caracterizaron parcialmente los sitios de unión a PRL en diferentes regiones del cerebro y los compararon con los sitios de unión en el riñón de una especie de sapo macho (*Bufo arenarum Hensel*). Se encontró que el BO presenta la más baja afinidad comparada con otras regiones cerebrales, como los hemisferios cerebrales, región dorsal y ventral del mesencéfalo, mientras en el riñón esta afinidad es aún más baja comparándola con las regiones anteriores. Por otro lado, tanto el riñón como el BO, mostraron tener un mayor número de sitios de unión a PRL comparado con las regiones cerebrales antes mencionadas (ver fig. 6). Adicional a esto muestran una inhibición competitiva de los sitios de unión a PRL por parte de la hormona de crecimiento.

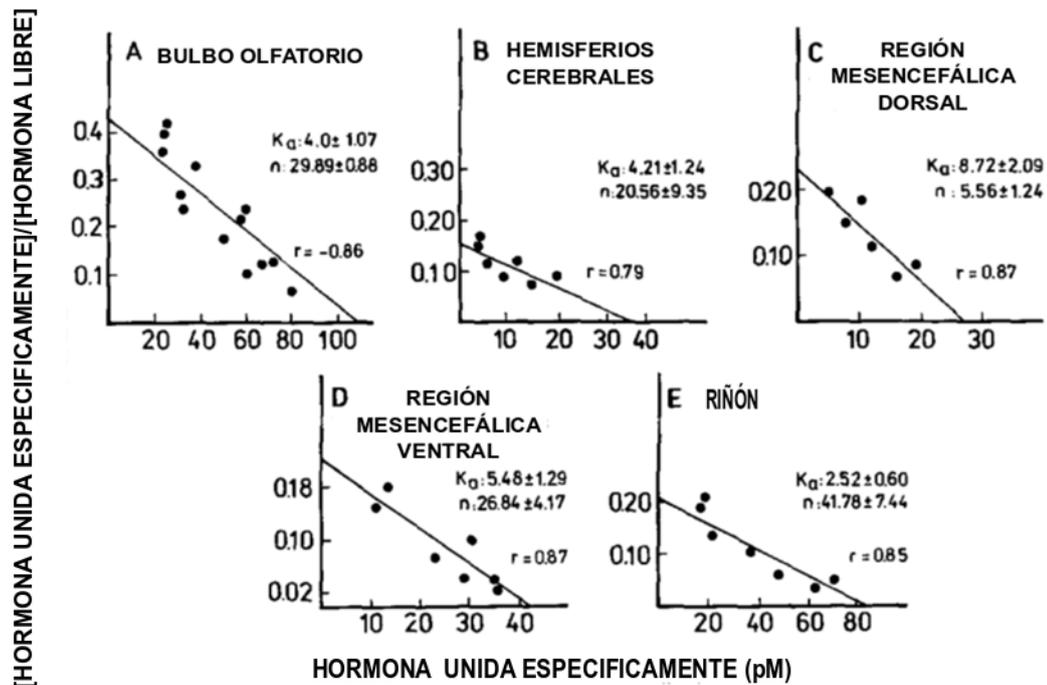


Fig. 6 Caracterización del número y afinidad de los sitios de unión a PRL en diferentes regiones del cerebro y riñón. En la parte superior de cada gráfica se indica la estructura en la cual se realizó el análisis de Scatchard para la unión de PRL, A. BO, B. hemisferios cerebrales, C. Región dorsal mesencefálica, D. Región ventral mesencefálica y E. riñón del sapo (*Bufo arenarum Hensel*). La pendiente nos da una idea de la afinidad del receptor por el ligando, a mayor pendiente mayor afinidad por el ligando. K_a indica la constante de afinidad a la PRL y n indica el número de sitios de unión a la misma. Los datos son expresados como fmol/mg de proteína. Tomado de Lüthy et al., (1985).

Freemark (1996), mediante hibridación *in situ* reportó la presencia del PRLR en el EO y la M/TC en ratas en etapas embrionarias (ver fig. 7). Ellos observaron la presencia del receptor a partir del día embrionario 18, siendo la señal más intensa en el epitelio periventricular, así como, en los cuerpos celulares de las NSO del EO. A partir del postnatal 5, la expresión de PRLR fue abundante en la M/TC y en cuerpos celulares del núcleo olfatorio anterior y la corteza piriforme.

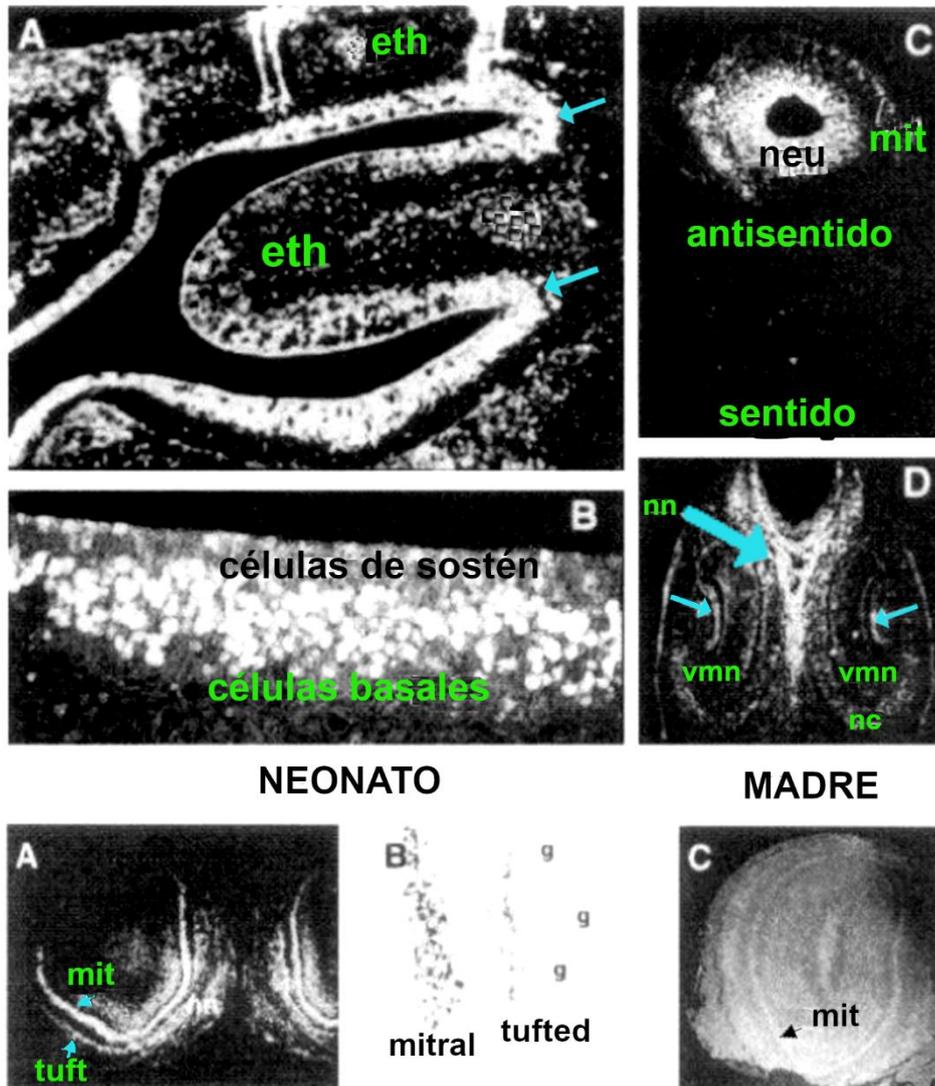


Fig. 7 El PRLR se expresa en el epitelio olfatorio y capa mitral del bulbo olfatorio. En todas las imágenes la marca más brillante indica la expresión del mRNA evidenciada por hibridación in-situ, la cual revela la localización del PRLR, a excepción de la imagen B, en el neonato, que se indica en negro. En la imagen de la parte superior se muestra la presencia del receptor, en una distribución irregular, en el etmoides (eth, A), en las células basales y de sostén del epitelio olfatorio (B), en un corte coronal del bulbo olfatorio, siendo la señal más intensa en el neuroepitelio periventricular que en la capa mitral (C) y el órgano vomeronasal (D). En las imágenes inferiores se muestran cortes coronales del bulbo olfatorio de un neonato en el postnatal 5 (A y B) y en una madre lactante (C). Se observa que la señal es menor en la madre lactante que en el neonato, el cual presenta una mayor intensidad en la CM/T. Tomado de Freemark, (1996).

Lo anterior es apoyado por el grupo de Grattan, D. R. (Aoki et al., 2019), el cual empleando una cepa de ratón *knock in* que expresa *Cre recombinasa* asociada al gen que codifica para la isoforma larga del PRLR usando una secuencia *IRES* (sitio interno de entrada al ribosoma) la cual permite etiquetar las células con expresión del PRLR con el marcador *GFP* (proteína verde fluorescente), muestra la presencia del receptor en diferentes partes del sistema olfatorio (Aoki et al.,

2019; Kokay et al., 2018). En el sistema olfatorio principal se observa en el EO, en las NSO y en sus proyecciones (ver fig. 8).

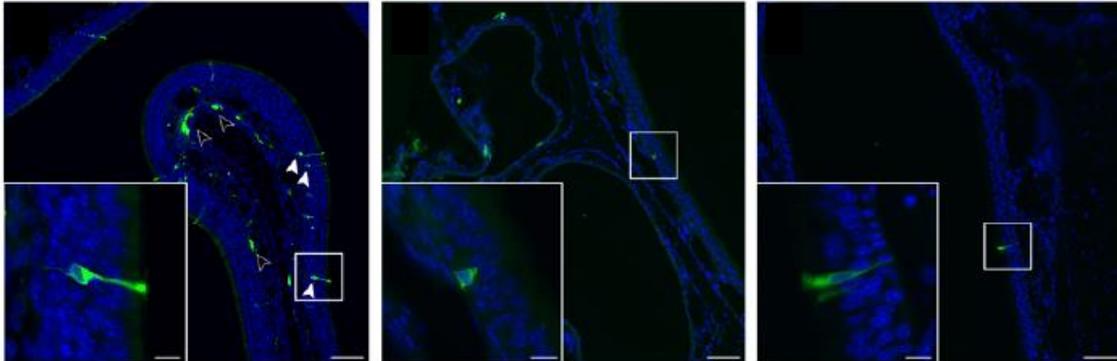


Fig. 8 Expresión del PRLR en el epitelio olfatorio en el ratón PRLR-IRES-CRE. En la imagen de la izquierda se observa la expresión de PRLR dado por las células GFP⁺ (en verde). Las puntas de flecha de color negro señalan la expresión en las neuronas sensoriales olfatorias y las puntas de flecha en blanco sus proyecciones. En la esq. inferior izq. de cada imagen se observa un acercamiento anatómico de la proyección de una neurona sensorial olfatoria (izq. y derecha) y una neurona sensorial olfatoria. La marca azul indica núcleos, las barras de escala en los acercamientos corresponden a 10 μ m y en la imagen principal a 50 μ m. Tomado de Aoki et al., (2019).

El papel de la PRL, en el hombre, tiene especial efecto en la reproducción y la homeostasis del organismo (Egli et al., 2010; Maria, 2016). En reproducción, hay una correlación negativa entre los niveles de esperma y la PRL. La PRL, al incrementar sus niveles actúa suspensivamente en la secreción de gonadotropinas afectando la función de los testículos. Tanto la PRL como sus receptores se expresan en el epitelio prostático, actuando como factor de crecimiento o protector.

En cuanto a la homeostasis del ambiente interno del organismo, la PRL, tiene principal efecto en el sistema inmune, el balance osmótico, la angiogénesis y la regulación metabólica. Actuando como mediador del sistema nervioso, endocrino e inmune (Macotela et al., 2020; Maria, 2016).

Justificación

La hiperprolactinemia es la alteración o desorden hormonal pituitario más común que se caracteriza por un exceso en los niveles de la hormona polipeptídica PRL (>20-25 ng/mL) que puede ser causada por condiciones fisiológicas y patológicas (La Torre & Falorni, 2007; Maria, 2016). Durante la lactancia y el embarazo, hay un aumento fisiológico de los niveles de PRL en suero, sin embargo, esta hormona también puede elevarse debido a cuestiones patológicas, tales como, prolactinomas, adenomas secretores mixtos, trastornos hipotalámicos e hipofisarios, por medicación, uso de antagonistas dopaminérgicos, como consecuencia clínica, falla renal (Lo et al., 2017), secreción de PRL ectópica, por causa genética, carencia del PRLR, entre otros (Bernard et al., 2019; Saleem et al., 2018).

Nonomura y colaboradores (1985), así como Bartke y colaboradores (1987), generaron un estado de hiperprolactinemia en ratones macho trasplantándoles la glándula pituitaria de hembras y, en ambos estudios observaron un aumento del peso de las vesículas seminales, próstata y en la concentración de la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante. Torner y colaboradores (2013), indujo artificialmente un estado de hiperprolactinemia en ratas macho, colocando injertos de pituitaria de una rata donante en el riñón del animal receptor. Al evaluar a las ratas en una prueba de reconocimiento de objetos, observó que los animales con hiperprolactinemia no eran capaces de discriminar entre un objeto novedoso y uno anteriormente presentado, reflejando tiempos de exploración similares hacia ambos objetos.

Por otra parte, en estudios preliminares de nuestro laboratorio (Corona et al., en preparación) en ratones hembra, se evidenció que, un estado de hiperprolactinemia generado en la edad adulta mediante inyecciones sistémicas de PRL durante 10 días, promueve modificaciones en la actividad eléctrica poblacional de las MC del bulbo olfatorio accesorio en su parte posterior, observándose en los animales tratados un aumento de la potencia (área bajo la curva) comparados con los controles. Además, al realizar el experimento con animales igualmente tratados, pero probando el efecto de agregar PRL al baño de registro electrofisiológico *in vitro*, se observó un incremento de la potencia de las MC en animales control, mientras que la potencia no se incrementa en los

tratados previamente con PRL más la presencia de esta hormona durante el registro. En un experimento similar, en donde se generó un estado de hiperprolactinemia en machos, en etapas tempranas (infantil/juvenil), se mostró un aumento de la activación de c-Fos en CG al exponer a los ratones tratados con PRL a olores sexualmente relevantes, comparado con el grupo sin tratamiento de PRL (*Corona et al., 2021*). Estos resultados sugieren que la PRL puede modular la actividad de las células del BO actuando directamente sobre células que expresan el receptor o indirectamente mediando la actividad de otras hormonas o neurotransmisores sobre el BO. Los estudios anteriores han mostrado que tratamientos para generar un estado de hiperprolactinemia en ratones en etapas tempranas y adultas, tanto en machos como en hembras, generan cambios funcionales en el BO que son dependientes de la edad y el sexo del animal, por lo cual es de interés evaluar los efectos de la hiperprolactinemia sobre la capacidad olfatoria en ratones macho en edad adulta.

En los experimentos de la presente tesis se utilizó la administración de sulpirida para inducir hiperprolactinemia. La sulpirida, un antagonista de los receptores D2, inhibe la acción de la DA sobre las neuronas TIDA promoviendo así la secreción de PRL. En dosis superiores a 40 mg/kg la sulpirida bloquea selectivamente neuronas dopaminérgicas postsinápticas, afectando solo a receptores D2/D3, resultando en una transmisión dopaminérgica reducida.

Hipótesis

La hiperprolactinemia en etapa adulta modificará la capacidad de detectar, identificar, reconocer y discriminar olores en pruebas de función olfatoria en ratones macho.

Objetivo General

Caracterizar los efectos de un periodo de hiperprolactinemia en la edad adulta sobre la capacidad olfatoria de ratones macho.

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de detección olfatoria mediante la prueba de alimento escondido de ratones macho con hiperprolactinemia generada por un tratamiento crónico de PRL y sulpirida.
- Evaluar la capacidad de detección de estímulos etológicamente relevantes mediante la prueba de preferencia sexual olfatoria en ratones macho con hiperprolactinemia generada por un tratamiento crónico de PRL y sulpirida.
- Evaluar la capacidad de memoria y discriminación olfatoria mediante la prueba de habituación deshabituación olfatoria en ratones con hiperprolactinemia generada por un tratamiento crónico de PRL y sulpirida.

Metodología

Animales

Se emplearon ratones de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad (35 - 40 g; número total de animales evaluados: 91). Previo al inicio de las pruebas conductuales (objetivos 1, 2 y 3) los ratones pasaron por un periodo de habituación en el cuarto de alojamiento durante dos semanas. Los animales fueron alojados en grupos de 2 - 4 animales con el fin de evitar ansiedad y estados depresivos en los sujetos (*Ieraci et al., 2016; Medendorp et al., 2018*). También se consideró si pertenecían o no a la misma camada con el objetivo de evitar comportamientos agresivos entre ellos que pudieran estresarlos (*Mähler et al., 2014*). Todos los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla. Los animales se mantuvieron en ciclo invertido de luz (12 horas oscuridad/luz), a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con agua y alimento *ad libitum* y $40 \pm 5\%$ de humedad relativa. Los experimentos se realizaron acorde a las regulaciones del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO 1999).

Tratamientos

Con el fin de incrementar los niveles circulantes de PRL en los ratones macho adultos se emplearon los siguientes tratamientos:

Prolactina

Se realizó la administración subcutánea (s.c.) de PRL ovina (5 mg/kg; PARLOW, Torrance, California, USA) la cual se disolvió en solución salina estéril al 0.9% para proporcionar la dosis adecuada para cada inyección y se mantuvo en refrigeración hasta su uso (*Brown et al., 2011, Salais-López et al., 2018*).

Sulpirida

Se empleó el antagonista de los receptores D2 para DA, la sulpirida, la cual inhibe la acción de la DA sobre las neuronas TIDA promoviendo la secreción de PRL. La sulpirida (Sigma-Aldrich, San Jose, California, USA) se disolvió en la mitad del volumen total calculado de solución salina estéril al 0.9% y se agregó gota a gota una solución de HCl 1 M mientras se mantenía en agitación. Luego se llevó a volumen final con la solución salina y se revisó que el pH de la solución fuera básico. La solución se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

En ambos tratamientos, los animales recibieron una sola inyección al día ya sea de sulpirida (50 mg/kg/s.c.) o PRL (5 mg/kg/s.c.) y los grupos vehículo recibieron inyecciones de solución salina (0.1 mL/s.c.). El grupo intacto fue alojado bajo las mismas condiciones que los grupos tratados y vehículo, pero sin recibir ninguna droga.

Determinación de la dosis adecuada de sulpirida para generar hiperprolactinemia

Para determinar la dosis a utilizar de sulpirida y debido a que se desconocen los efectos de este fármaco sobre la producción de PRL, se realizó una curva dosis-respuesta en la cual se utilizaron tres concentraciones: 25, 50 y 100 mg/kg más un grupo vehículo que funcionó como control. En este experimento, se utilizaron ratones macho CD1, los cuales recibieron inyecciones s.c. del fármaco durante 14 días (mismo tiempo de tratamiento que el resto de los experimentos). Al finalizar el tratamiento, los ratones fueron sacrificados por decapitación y se extrajo la hipófisis para cuantificar la expresión del mRNA de Prl y del Prlr mediante qPCR (de sus siglas en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*).

Brevemente, la hipófisis se almacenó en 150 µl de solución Trizol (introvigen) agente que permite la extracción de RNA y facilita la lisis celular y se mantuvo a -80 °C hasta su procesamiento. Se extrajo el mRNA con un kit (Zymo Research) y se procedió con la síntesis del DNA complementario (cDNA). Se mezcló en un tubo libre de nucleasas 1 µL de random primers, 1 µg de RNA total, 1µL de mix de 10 mM de dNTPs y se llevó a volumen final de 12 µL con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min, posteriormente se provocó un choque térmico en hielo, seguido de un pulso de centrifugación. Posteriormente se añadió 4 µL de buffer de primera hebra 5X, 2 µL de ditiotreitolo 0.1 M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasas. Esta segunda mezcla se incubó 2 minutos a 37 °C, para posteriormente añadir 1 µL de retrotranscriptasa de virus de leucemia murina moloney M-MLV. Una vez añadida la retrotranscriptasa, se incubó 10 min a 25 °C, 50 min a 37 °C, luego 70 °C durante 15 minutos para detener la reacción. Para la reacción de qPCR, se añadió en un microtubo 5 µL del master mix de SYBR Green (Thermofisher Scientific), 0.5 µL de forward primer, 0.5 µL reverse primer, 1 µL de libre de nucleasas y 3 µL cDNA en dilución. Se incubó la muestra por 2 minutos a 94 °C para desnaturalizarla. Se realizaron 40 ciclos de PCR. Los oligos empleados fueron los siguientes: Prl-[(F) 5'-AACCTGATCCTCAGTTTGGTG -3', (R) 5'-CCTCAATCTCTTTGGCTCTTG-3'], Prlr-L-[(F) 5'-ACCTGCATCTTTCCACCAGTT-3', (R) 5'-CCAGAGTCACTGTAGGGATCT -3'].

Cuantificación de mRNA de Prl y del Prlr en hipófisis

Con el objetivo de determinar la dosis adecuada de sulpirida para generar una hiperprolactinemia, se cuantificó por qPCR, la expresión relativa del mRNA tanto de Prl como del Prlr en la hipófisis. Se inyectaron dos animales por dosis, de los cuales fueron colectadas sus hipófisis para su posterior procesamiento. Promediando la $2^{\Delta\Delta CT}$ de cada animal se realizó la siguiente gráfica (ver fig. 9). La expresión relativa del mRNA del Prlr de cada pareja fue: vehículo (1.0 ± 0.063), 25 mg/kg (2.1 ± 0.29), 50 mg/kg (5.4 ± 0.47), 100 mg/kg (2.3 ± 0.20), para la expresión relativa del mRNA de la Prl de cada pareja fue: vehículo (1.0 ± 0.11), 25 mg/kg (1.5 ± 0.016), 50 mg/kg (7.6 ± 0.43), 100 mg/kg (2.2 ± 0.44) (ver fig. 9). Visualmente se aprecia que los promedios de los niveles de expresión tanto para

el Prlr como para la Prl son más altos a una dosis de 50 mg/kg comparado con el resto. Por esta razón se eligió trabajar con la dosis de 50 mg/kg.

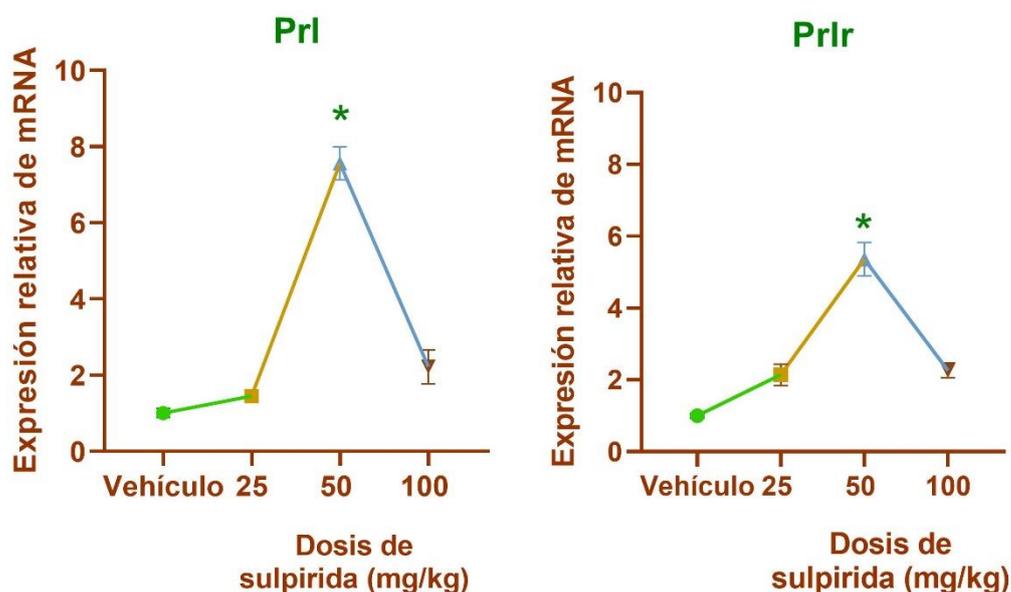


Fig. 9 Curva dosis-respuesta de sulpirida sobre la expresión relativa del mRNA de Prl y Prlr. En el eje x se presenta de izquierda a derecha las dosis empleadas: vehículo (inyecciones s. c. de salina 0.9%), 25 (dosis de sulpirida de 25 mg/kg), 50 (dosis de sulpirida de 50 mg/kg) y 100 (dosis de sulpirida de 100 mg/kg). En el eje y se refleja la expresión relativa del mRNA de Prl (gráfica izquierda) y el Prlr (gráfica derecha). Los datos son expresados como la media \pm EEM, * indica la dosis en la que se observó mayor expresión de mRNA del Prlr como de la Prl.

Diseño experimental

Para evaluar los efectos de un tratamiento crónico que promueva la elevación de los niveles circulantes de PRL sobre la conducta olfatoria de ratones macho se realizaron dos experimentos como se explica a continuación. En ambos experimentos, las pruebas de capacidad olfatoria se realizaron antes de que los animales recibieran el tratamiento correspondiente, durante el tratamiento y una semana después de haberlo finalizado cada uno de los tratamientos. Esto con la finalidad de eliminar del estudio todo aquel animal que no mostrara el patrón de conducta esperado previo a comenzar los tratamientos, durante, para conocer efectos a corto plazo y al finalizar, para conocer si hay efecto posterior al tratamiento.

Experimento 1

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto sobre la capacidad olfatoria de ratones macho (n=8) con hiperprolactinemia generada por manipulación hormonal (inyecciones s.c. de PRL, 5 mg/kg) o por manipulación farmacológica (inyecciones s.c. de sulpirida, 50 mg/kg). Para poder evaluar este objetivo se diseñó el siguiente protocolo experimental: se utilizó un grupo vehículo y dos grupos en los cuales se buscó incrementar los niveles circulantes de PRL. El incremento de los niveles circulantes de PRL se realizó mediante diferentes condiciones experimentales: en la primera condición se utilizó sulpirida, un antagonista de los receptores D2 de DA, con el cual se buscó incrementar los niveles de PRL, y una segunda condición, en la cual se administró la PRL ovina. El grupo control recibió de manera crónica la solución vehículo. Los tratamientos fueron mediante inyecciones s.c. por 14 días de solución salina, sulpirida o PRL. Todas las inyecciones se realizaron entre las 4:00-5:00 pm en un espacio distinto al cuarto de alojamiento.

Experimento 2

En los siguientes grupos a tratar se optó por la sulpirida para generar un estado de hiperprolactinemia (n=56). Se incluyeron tres grupos: intacto, vehículo y sulpirida. El intacto, a excepción de los grupos restantes no recibió inyecciones y permaneció así hasta el final del experimento. Los grupos vehículo y sulpirida, recibieron inyecciones de igual forma que en el experimento 1, la sustancia vehículo (0.1 mL/ solución salina 0.9%) o el fármaco (sulpirida, 50 mg/kg) por 14 días (ver fig.10).

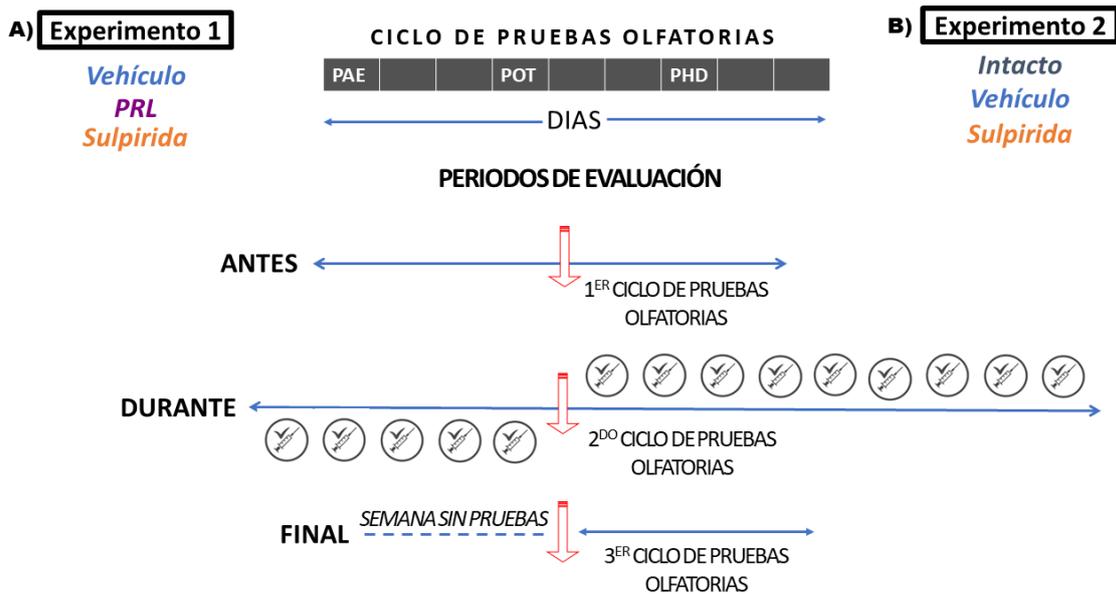


Fig. 10 Esquema ilustrativo del diseño experimental para los experimentos 1 y 2. En A) se indican los grupos que se incluyeron para el experimento 1 y B) los grupos que conformaron el experimento 2. En la parte central superior de la imagen se ilustra el ciclo de pruebas olfatorias realizado, cada recuadro del gráfico representa un día. Las siglas PAE, POT y PHD corresponden a la prueba de alimento escondido, prueba de preferencia sexual olfatoria y a la prueba de habituación/deshabituación olfatoria, respectivamente. Ambos experimentos consistieron en tres periodos de evaluación: antes, en el cual se aplicaron las pruebas olfatorias previo a comenzar los tratamientos, durante, en el cual se aplicó por segunda vez el ciclo pruebas olfatorias tras 5 inyecciones de los respectivos tratamientos, y final, en el cual tras finalizar el número total de inyecciones y haber transcurrido una semana sin pruebas se aplicó nuevamente el ciclo de pruebas olfatorias.

Pruebas olfatorias

Para la realización de las pruebas se usaron estímulos olfatorios etológicamente relevantes y estímulos generales (no etológicamente relevantes). Los primeros tienen un significado fisiológico para el animal y existe un interés conservado hacia ellos (*Jaquetia et al., 2018*). Las pruebas se realizaron acorde a su complejidad midiendo así, por niveles de procesamiento olfatorio, la capacidad olfatoria de los animales (*Zolotykh & Kozhevnikova, 2017*). Se inició con la prueba de alimento escondido (estímulo general), la cual permite conocer si un animal es capaz de detectar o no el estímulo y descartar en pruebas posteriores a todo aquel sujeto que no lo hace. La segunda prueba, preferencia sexual olfatoria, en la cual se emplean los estímulos etológicamente relevantes y permite conocer, con base al tiempo de olfacción, si el animal es capaz de identificar y presentar preferencia hacia el estímulo fisiológicamente relevante. La tercera prueba, habituación-deshabituación olfatoria, permite conocer la capacidad de memoria y discriminación olfatoria de estímulos generales.

Además del orden en que se realizaron las pruebas, se consideró dejar un espacio de dos días entre cada prueba para evitar sesgos o alteraciones adversas en las respuestas olfatorias medidas en los animales. Todas las pruebas se realizaron en el ciclo de oscuridad debido a que los ratones son animales que presentan su mayor actividad en la fase de oscuridad (*Goulding et al., 2008*). Todas las pruebas se explicarán a detalle a continuación:

Prueba de alimento escondido (PAE)

Con el fin de evaluar la capacidad de detección olfatoria de cada uno de los animales, se realizó la prueba conductual de *alimento escondido* (*Alvarado-Martínez et al., 2013; Fleming, 2014; Machado et al., 2018; Yang & Crawley, 2009; Zhou et al., 2017*). Tres días previos a la realización de la prueba conductual se le colocó a cada animal una pieza del alimento que posteriormente iba a ser usado como estímulo en la prueba, esto con el objetivo de evitar tener un efecto de neofobia al momento de realizar la evaluación conductual.

Esta prueba consistió en dos fases: una visible y otra no visible (alimento escondido). La prueba visible, consistió en colocar el alimento a la vista del animal en una posición específica. Una vez que finalizó la prueba visible, se privó a los animales de alimento por un periodo de 8 horas con la finalidad de uniformar su motivación para la siguiente fase de la prueba (*Machado et al., 2018*). En la prueba no visible, el alimento (con las mismas características que el usado en la prueba visible) se encontraba escondido en una posición opuesta a la que se había colocado en la prueba visible y a una profundidad de 2 cm por debajo del nivel del aserrín. El parámetro evaluado en esta prueba fue la latencia para encontrar el alimento, definida como el tiempo en que el ratón tarda en olfatear por primera vez el alimento visible o desenterrar el alimento no visible. El tiempo máximo que se le permitió al animal explorar la caja para encontrar el alimento fue de 300 s (5 min) (*Guerrero-Gómez, 2018*). La primera fase de la prueba se realizó después del cambio de luz (8:30 am a 9:30 am). Al finalizar esta fase, se privó a los animales y se realizó la fase no visible, la cual se llevó a cabo de 4:30 a 5:30 pm.

Prueba de preferencia sexual olfatoria (POT)

Los roedores identifican a una potencial pareja para el apareamiento mediante el uso de señales olfatorias (*Brennan & Keverne, 2015; Lin et al., 2005;*

Pankevich et al., 2004; Portillo & Paredes, 2004). Valiéndonos del hecho de que la orina contiene componentes volátiles (*Lin et al., 2005; Muroi et al., 2006; Pankevich et al., 2004; Yoshikage et al., 2007*), se emplearon camas de aserrín impregnadas con orina de hembras sexualmente receptivas y machos sexualmente expertos (*Swaney et al., 2007; Thonhauser et al., 2019*). La recolección de las camas de aserrín se realizó de la siguiente manera. Para los machos se utilizó la mezcla de aserrín de dos machos sexualmente expertos en la que permanecieron por 52 horas sin haber sido cambiada. Se consideraron como machos sexualmente expertos a machos que hubieran preñado al menos a una hembra. De la misma forma se colectó la cama de aserrín de dos hembras sexualmente receptivas (período que comienza al final de la etapa de proestro y principio del estro, cuando los niveles de progesterona y estrógeno se incrementan preparando así el organismo para la fertilización). Se utilizaron hembras ovariectomizadas tratadas hormonalmente para inducirles la receptividad sexual mediante inyecciones s.c. de benzoato de estradiol (50 µg) por dos días y una inyección de progesterona (100 µg) 4 horas antes de considerarse receptivas (*Corona et al., 2011*). Todos los animales empleados para obtener el aserrín son de la misma cepa que los animales que fueron sujetos de prueba. El aserrín se mantuvo aislado con el uso de tubos cónicos perforados para evitar que los animales tuviesen contacto físico con el aserrín, y, de esa forma, poder evaluar la activación del BO obteniendo solo el componente volátil del estímulo (*Martel, 2009; Martel & Baum, 2009; Muroi et al., 2006; Yoshikage et al., 2007*).

Para esta prueba se empleó una caja de acrílico transparente (71 cm de largo, 36 cm de alto y 27 cm de ancho) en la cual se observa claramente el comportamiento del animal, además, tiene espacio suficiente para desplazarse adecuadamente. Los animales pueden elegir entre tres diferentes estímulos: aserrín limpio, cama de aserrín de un macho sexualmente experto y cama de aserrín de hembra sexualmente receptiva. Los tubos que sirvieron para aislar el aserrín se colocaron en posiciones aleatorias en la caja, luego el resto de la superficie fue cubierta con aserrín. Uno de los tubos se colocó a la mitad de la caja y los dos restantes en las esquinas frontales de la caja. La cantidad de aserrín que se colocó de cada estímulo siempre fue de 3 g. Dado que se quería

obtener el componente volátil del estímulo, éste fue alojado en hielo y no fue empleado más allá de una hora después de haber sido colectado. Es importante resaltar que los sujetos experimentales empleados en la prueba carecían de experiencia sexual y permanecieron así durante todo el tratamiento. Para la prueba, el animal se depositó inicialmente en la parte frontal media de la caja durante 30 min, como habituación previa al contexto experimental, para ello se colocaron los tubos tal como se describió anteriormente, pero esta vez todos con aserrín limpio.

Una vez terminado el periodo de habituación el animal fue trasladado a su caja de alojamiento para hacer el cambio de dos de los tubos por los estímulos a evaluar. Nuevamente se colocó al animal en la caja para evaluarlo durante 10 minutos. Los tres compartimentos que contienen la cama de aserrín fueron dispuestos al azar para eliminar la influencia de la preferencia posicional en las diferentes fases del tratamiento. El único parámetro evaluado en esta prueba fue el tiempo de olfacción hacia cada uno de los estímulos. Toda la prueba se videograbó y almacenó para su posterior análisis (ver fig.11).



Fig. 11 Representación que muestra una de las configuraciones de organización de los estímulos olfatorios en la prueba de preferencia sexual olfatoria. En la imagen se observan los tres estímulos olfatorios a los que fue expuesto el sujeto de prueba: A. aserrín limpio, B. aserrín de machos sexualmente expertos y C. aserrín de hembras receptivas.

Prueba de habituación-deshabitación olfatoria (PHD)

En esta prueba conductual se evaluó la capacidad de memoria y discriminación olfatoria de cada animal (*Fleming, 2014; Nitenson et al., 2015; Perez-Villalba et*

al., 2015; Yang & Crawley, 2009). La habituación (memoria) consiste en la disminución de la respuesta a un estímulo invariable en cada presentación, mientras que la deshabituación (discriminación) es la capacidad de responder nuevamente a un estímulo diferente al anterior, es decir, que el animal renueve su interés por el odorante novedoso (*Coronas-Samano et al., 2016; Schmid et al., 2015*). Si se observa una disminución en la respuesta a un estímulo específico tras varias presentaciones, se considera que el animal se habituó y, por lo tanto, que el animal reconoce que el odorante ha sido presentado con anterioridad (*Chaudhury et al., 2010b; Rankin et al., 2009; Sinding et al., 2017*). Por otra parte, si al presentarle un estímulo diferente al anterior el animal aumenta su respuesta (olfateo), es una prueba de que el sujeto se deshabituó y, por lo tanto, que es capaz de discriminar entre el odorante presentado la última vez y el siguiente (*Nitenson et al., 2015; Guerrero-Gómez, 2018*). Para la realización de esta prueba, el animal se habituó por 30 min al contexto experimental y se mantuvo en ese lugar para el resto de la prueba. Durante la tarea, el animal fue expuesto a muestras de una sustancia que funcionó como control (olor neutral), y a dos odorantes diferentes (*Devore et al., 2012*). Para evaluar a cada animal, se presentaron dos muestras consecutivas de la sustancia control (aceite mineral) y tres muestras consecutivas del mismo odorante, estos a una concentración de 10% v/v en aceite mineral. Todas las presentaciones se realizaron en un papel filtro (1cm²) al que se agregó un volumen de 5 µL tanto de la sustancia control como del odorante y se colocaron en un recipiente metálico (1 cm de diámetro) sobre la jaula del ratón. La duración de cada presentación de odorante fue de 2 minutos con un periodo inter-estímulo (ITI, por sus siglas en inglés) de 1 minuto. El ITI es definido como el tiempo entre las exposiciones de cada odorante. Este tiempo debe permitir al animal mostrar las conductas olfatorias específicas para cada estímulo olfatorio sin resultar en una pérdida general del interés por la tarea. Es importante tener en cuenta que un ITI muy prolongado puede cambiar el valor de novedad de cada ensayo (*Breton-Provencher et al., 2009*), mientras que las ITI muy cortas pueden inducir a una habituación a contexto demasiado rápido (*Sanderson & Bannerman, 2011*).

El orden de los odorantes se contrabalanceó. En esta prueba se evaluó el parámetro del tiempo de olfacción del sitio donde se encontraba el odorante. Toda la prueba se videograbó y almacenó para su posterior análisis.

Evaluación de efectos secundarios generados por el tratamiento

Para determinar si los tratamientos utilizados para generar hiperprolactinemia alteraron el consumo alimenticio y la ganancia de peso en los ratones, los animales se pesaron cada tercer día y se monitoreó su consumo alimenticio diariamente. La determinación de la ingesta se realizó pesando el alimento de los animales diariamente, desde su ingreso hasta el día de su sacrificio, cuidando que la cantidad de alimento en su jaula no bajara más allá de los 40 g, ya que en promedio un animal consume aproximadamente de 8-10 g por día.

Evaluación de la actividad locomotora espontánea

Con el objetivo de descartar efectos motores en los animales generados por el tratamiento con el fármaco sulpirida se destinó un grupo de 24 animales, los cuales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos, vehículo y sulpirida, cada grupo con 12 animales.

La actividad locomotora de estos animales se registró usando un *Digiscan Animal Activity Monitor (Omnitech Electronics, OH, USA)*, el cual ha sido descrito previamente (*Sanberg et al., 1985*). Brevemente, todos los ratones fueron previamente aclimatados a las condiciones del cuarto donde realizarían la conducta durante una hora y media. Posteriormente, cada ratón fue colocado individualmente dentro de una cámara de actividad locomotora automatizada equipada con rayos infrarrojos horizontales y verticales. La actividad locomotora fue registrada durante un periodo de 4 horas (ciclo invertido de luz). Esta evaluación se ejecutó en los mismos periodos en los cuales fueron realizadas las pruebas olfatorias. Los datos fueron recolectados cada 15 minutos. No se proporcionó alimento ni agua durante el periodo de registro. Los parámetros evaluados fueron distancia total (la distancia recorrida por el animal en cm en un tiempo determinado), actividad horizontal (número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo determinado), recuento de actividad de episodios estereotípicos (número de veces que el sistema registra comportamientos estereotipados en el animal; se requiere un espacio de un segundo o más para

separar un episodio estereotipado del siguiente) y distancia al margen (distancia recorrida en el margen de la caja en un tiempo determinado).

Análisis de resultados

Tras realizar la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson se procedió a realizar las pruebas estadísticas correspondientes de acuerdo con la distribución de los datos. En todos los casos un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativamente diferente. Los datos se encuentran representados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism 8.0. (GraphPad, San Diego, CA).

Los datos respectivos al experimento 1 (ver el apartado de diseño experimental para más detalles) son descriptivos, ya que el número de animales que conforman cada uno de los grupos evaluados es menor o igual a 3.

Para la prueba de habituación-deshabituación en el experimento 2, se optó por tomar tres indicadores: tiempo de investigación, índice de habituación e índice de discriminación. El tiempo de investigación, se calculó promediando las tres primeras presentaciones de cada olor presentado en la prueba. El índice de habituación se calculó promediando las últimas presentaciones de cada olor y el índice de discriminación, se calculó promediando las diferencias de la primera presentación del olor con la última presentación del olor anterior a él (Hutch et al., 2015; Le Pichon, 2008). Todos aquellos animales que no habituaron o no discriminaron a uno de los dos olores presentados, o bien, no olfatearon ninguno de los estímulos, se descartaron del análisis.

Resultados

Experimento 1

Evaluación de la capacidad olfatoria en un modelo de hiperprolactinemia inducida farmacológicamente con sulpirida o por la inyección sistémica de la hormona PRL

Con el objetivo de conocer los efectos de un periodo de hiperprolactinemia sobre la capacidad olfatoria en ratones macho CD1, se evaluaron los siguientes grupos: vehículo (sol. salina 0.9%), sulpirida (50 mg/kg) y PRL (5 mg/kg). Lo anterior con la finalidad de evidenciar la existencia de efectos diferenciales del fármaco y la hormona, administrados de manera crónica, sobre la conducta

olfatoria no relacionada a estímulos fisiológicamente relevantes. Antes de iniciar los respectivos tratamientos se realizó la batería de pruebas conductuales descrita en la sección de metodología en todos los animales (ver fig.10).

Prueba de alimento escondido

En la prueba de PAE, una prueba t no pareada mostró que todos los animales son capaces de identificar tanto de manera visible (8.1 ± 1.9 s) como no visible (escondido) (115 ± 25 s) el alimento ($t_{(8.094)} = 4.3$, $p = 0.0003$, $n = 9$) (ver fig.12).

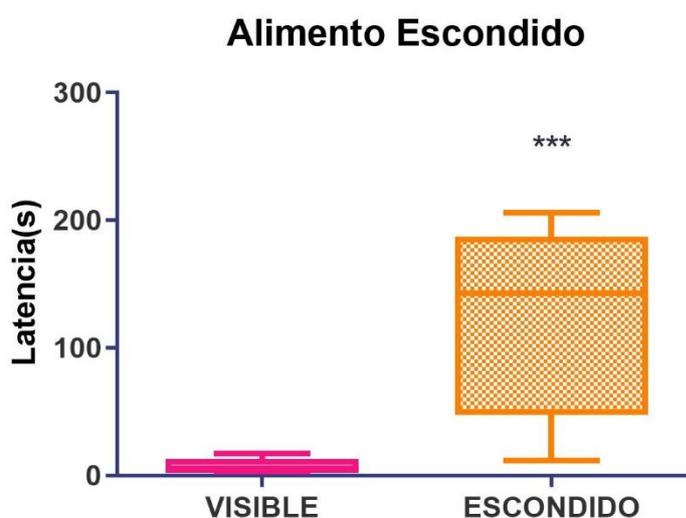


Fig. 12 Respuesta conductual en la prueba de alimento escondido previo al tratamiento. Se muestra en el eje de las x las condiciones bajo las cuales se le presentó el estímulo olfatorio (galleta *triki trakes*®) a cada uno de los animales, visible (caja rosa) y no visible (caja naranja). En el eje y se grafica la latencia dada en segundos para descubrir el alimento. Se observa que de manera visible los animales identifican más rápido el alimento. Los datos se representan como cajas de *Tukey*. Los asteriscos denotan una diferencia de $p = 0.0005$, $n = 9$.

Prueba de preferencia sexual olfatoria

Para la prueba de POT, se realizó una ANOVA de una vía y, tras realizar una prueba post-hoc para múltiples comparaciones de *Tukey*, se observó que los animales son capaces de identificar la cama de aserrín de un macho sexualmente experto versus aserrín limpio (42 ± 8.6 s vs. 4.8 ± 0.95 s, $p = 0.0134$), de una hembra receptiva versus aserrín limpio (112 ± 12 s vs. 4.8 ± 0.95 s, $p < 0.0001$) y macho sexualmente experto versus hembra receptiva (42 ± 8.6 s vs. 112 ± 12 s, $p < 0.0001$) ($F_{(2,24)} = 42$, $p < 0.0001$, $n = 9$) (ver fig.13).

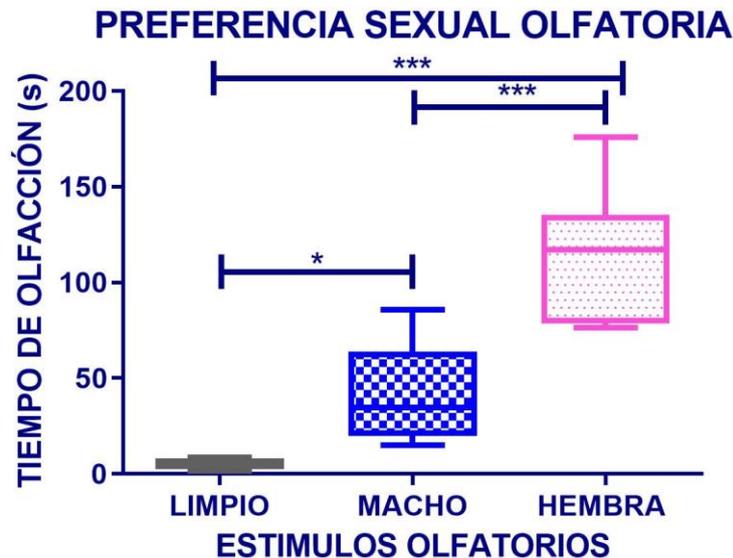


Fig. 13 Preferencia sexual olfatoria previo al tratamiento. Se muestra en el eje X cada uno de los estímulos olfatorios que le fueron presentados simultáneamente a cada uno de los ratones, limpio (caja gris), macho (caja azul) y hembra (caja rosa pálido). En el eje de las y se gráfica el tiempo que pasan olfateando los diferentes estímulos, se observa que los animales son capaces de diferenciar la cama de aserrín sucio, ya sea de hembra o de macho, del aserrín limpio. Además, se observa que los animales olfatean más el aserrín de hembra que el aserrín de macho. Los datos se representan como cajas de *Tukey*. Los asteriscos denotan una diferencia de *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.0005$, $n = 9$.

Prueba de habituación-deshabituación olfatoria

De igual manera, para la prueba de PHD, tras realizar la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de Dunns para parejas de columnas seleccionadas se encontraron diferencias significativas, evidenciando que los animales son capaces de habituarse (Aceite Mineral vs. Aceite Mineral 2 (0.74 ± 0.61 s vs. 0.46 ± 0.39 s, $z = 0.42$, $p > 0.9999$); Canela 1 vs. Canela 2 (1.9 ± 0.34 s vs. 0.11 ± 0.074 s, $z = 3.2$, $p < 0.0092$); Canela 1 vs. Canela 3 (1.9 ± 0.34 s vs. 0.0 ± 0.0 s $z = 4.0$, $p < 0.0005$); Limón 1 vs. Limón 2 (1.6 ± 0.30 s vs. 0.0 ± 0.0 s, $z = 3.8$, $p = 0.0010$); Limón 1 vs. Limón 3 (1.6 ± 0.30 s vs. 0.057 ± 0.057 s, $z = 3.4$, $p = 0.0043$)) y discriminar entre los olores (Aceite Mineral 2 vs. Canela 1 (0.46 ± 0.39 s vs. 1.9 ± 0.34 s, $z = 2.9$, $p = 0.0249$); Canela 3 vs. Limón 1 (0.0 ± 0.0 s vs. 1.6 ± 0.30 s $z = 3.8$, $p = 0.0010$)) empleados en la prueba de habituación-deshabituación ($H(7) = 35.83$, $p < 0.0001$, $n = 7$) (ver fig.14).

Prueba de Habitación-Deshabitación

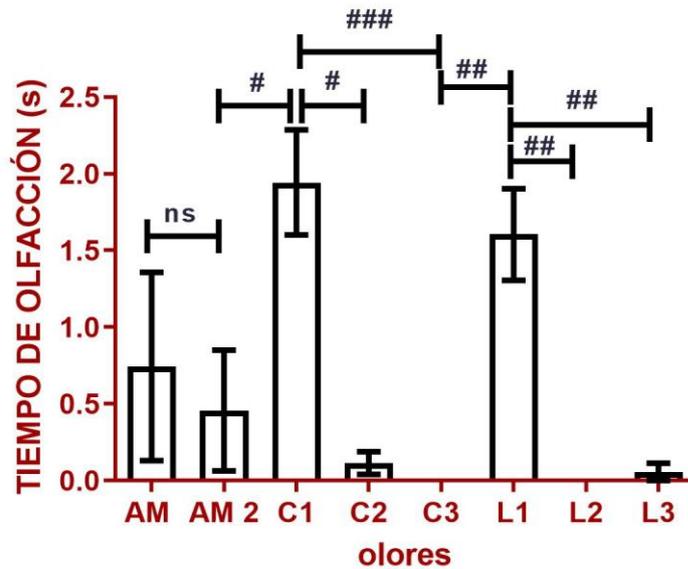


Fig. 14 Pruebas de habituación- deshabitación olfatorias previas al tratamiento. Se muestra en el eje x el número de repeticiones y tipo de estímulos a los que fueron expuestos los animales. El olor que funcionó como olor control, AM, representa aceite mineral, C, canela y L, limón. En el eje y se muestra el tiempo que los animales permanecen olfateando cada uno de los estímulos. Se observa que los animales son capaces de habituarse y discriminar a olores. Los datos son representados como la media \pm EEM, ns denota no significativo, el numeral denota diferencia significativa, $n = 7$, # $p < 0.05$; ## $p < 0.005$; ### $p < 0.0005$.

Una vez evaluada la conducta olfatoria para todos los animales previo al tratamiento, y haber transcurrido una semana sin pruebas, se iniciaron los tratamientos respectivos. Una vez concluidas 5 inyecciones, en el sexto día, se comenzó a realizar nuevamente la batería de pruebas conductuales siguiendo el mismo orden, las cuales corresponderían al periodo de evaluación durante el tratamiento. Al concluir el número total de inyecciones (14 inyecciones), y una semana después de haber finalizado los tratamientos, se volvió a aplicar la batería de pruebas olfatorias correspondiente al periodo de evaluación final (nuevamente ver fig. 10).

Detección olfatoria con la prueba de alimento escondido en los distintos periodos de evaluación de los tratamientos para generar hiperprolactinemia

Dado que el desempeño conductual de los animales fue el esperado se prosiguió por dividirlos aleatoriamente en grupos, conformándose un grupo vehículo, que

en lo sucesivo funcionara como grupo control, un grupo para ser tratado con la PRL y otro para ser tratado con el fármaco sulpirida.

Los animales detectaron una pieza de galleta de manera visible en los distintos periodos de evaluación en la prueba de alimento escondido (ver tabla 1).

VISUAL									
Periodo de evaluación	Vehículo			PRL			Sulpirida		
	n	Media(s)	EEM	n	Media(s)	EEM	n	Media(s)	EEM
Antes	3	6.55	3.47	3	6.68	3.15	2	14.73	2.45
Durante		2.86	0.44		6.31	0.54		3.97	0.41
Final		3.12	0.75		13.21	8.20		3.11	1.42

Tabla 1. Latencia para descubrir el alimento de manera visible. En la fila superior se especifica la fase de la prueba que se evaluó. Se indica también el periodo de evaluación en el cual se realizó la prueba y los respectivos grupos Vehículo, PRL y Sulpirida. Las medias indican el tiempo en segundos que le tomó a cada animal descubrir el alimento.

En la siguiente fase de la prueba, cuando el alimento se encuentra escondido, y el animal depende únicamente de su función olfatoria para detectarlo, se observa una disminución en la latencia para encontrarlo, siendo esto observable en los tres grupos y manteniéndose aún tiempo después de haber finalizado los tratamientos (ver tabla 2).

ESCONDIDO									
Periodo de evaluación	Vehículo			PRL			Sulpirida		
	n	Media(s)	EEM	n	Media(s)	EEM	n	Media(s)	EEM
Antes	3	145.48	20.32	3	98.35	47.32	2	125.91	80.19
Durante		52.94	34.28		35.06	19.98		100.87	52.76
Final		68.14	22.77		58.12	28.28		28.22	3.66

Tabla 2. Latencia para descubrir el alimento cuando este se encuentra oculto. En la fila superior se especifica la fase de la prueba que se evaluó. Se indica también el periodo de evaluación en el cual se realizó la prueba y los respectivos tratamientos Vehículo, PRL y Sulpirida. Las medias indican el tiempo en segundos que le tomó a cada animal descubrir el alimento.

Preferencia sexual olfatoria en los distintos periodos de evaluación de los tratamientos para generar hiperprolactinemia

En todos los grupos experimentales se observa claramente que los animales son capaces de identificar las camas de aserrín de hembras receptoras y machos

sexualmente expertos de una cama de aserrín limpio. Esto se mantiene en los siguientes periodos de evaluación en todos los grupos, sin embargo, el tiempo de olfacción para todos los estímulos se ve modificado en los posteriores ensayos de la prueba excepto para la cama de aserrín limpio que se mantiene con tiempos de olfacción bajos. A diferencia de los grupos PRL y vehículo, solo el grupo sulpirida mantiene una clara preferencia por el aserrín de hembra, el resto muestra un interés similar al aserrín de una hembra receptiva que, al aserrín de macho sexualmente experto dado por el tiempo de olfacción, el cual se ve disminuido tras haber iniciado el tratamiento (ver tabla 3).

Preferencia Olfatoria								
Grupo	Periodo de Evaluación	Limpio			Macho		Hembra	
		n	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM
Vehículo	Antes	3	5.87	1.48	41.83	17.82	91.40	12.93
	Durante		13.83	5.85	29.47	5.51	35.33	6.81
	Final		16.00	1.97	37.07	12.88	50.53	16.59
PRL	Antes	3	2.27	0.58	20.27	0.48	97.67	18.16
	Durante		4.81	0.79	63.73	8.90	72.39	6.40
	Final		1.33	0.96	9.53	3.53	15.73	7.16
Sulpirida	Antes	2	4.80	2.40	68.95	16.65	156.22	19.37
	Durante		12.60	1.00	27.20	9.60	123.57	65.35
	Final		14.80	4.80	38.00	6.80	111.60	56.40

Tabla 3. Preferencia sexual olfatoria en los distintos tratamientos para inducir hiperprolactinemia. En la tabla, de izquierda a derecha en la primera columna se indica cada uno de los grupos evaluados, los periodos de evaluación, el número total de animales evaluados y cada uno de los estímulos olfatorios a los cuales fueron expuestos los animales. La tabla presenta el tiempo de olfacción en segundos a cada uno de los estímulos.

Habitación y discriminación olfatoria evaluada mediante la prueba de habitación-deshabitación olfatoria en los distintos periodos de evaluación del tratamiento para generar hiperprolactinemia

Antes de comenzar el tratamiento todos los grupos muestran claramente su capacidad para habituarse y discriminar olores (como se muestra en la fig. 14). Cuando se realiza nuevamente la prueba en el período de evaluación durante el tratamiento podemos observar, que únicamente el grupo de machos que recibió el tratamiento de sulpirida mostró una alteración en la capacidad para habituarse y discriminar olores, sin embargo, esto no ocurre con los machos tratados con PRL. En la valoración final que se realiza tras una semana de haber finalizado el

tratamiento, tanto los machos tratados con sulpirida como los tratados con PRL pierden su capacidad para habituarse y discriminar a olores (ver tabla 6).

Prueba de Habitación-Deshabitación						
Período de Evaluación	Antes					
Grupo	Vehículo		PRL		Sulpirida	
Olores	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM
Aceite Mineral 1	1.47	1.47	0.20	0.20	0.20	0.20
Aceite Mineral 2	0.93	0.93	0.20	0.20	0.00	0.00
Canela 1	2.13	0.74	1.80	0.60	1.80	0.60
Canela 2	0.27	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
Canela 3	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00
Limón 1	1.61	0.64	2.00	0.40	1.20	0.40
Limón 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Limón 3	0.00	0.00	0.20	0.20	0.00	0.00
Período de Evaluación	Durante					
Grupo	Vehículo		PRL		Sulpirida	
Olores	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM
Aceite Mineral 1	2.27	1.54	0.93	0.35	0.60	0.20
Aceite Mineral 2	0.93	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00
Canela 1	1.47	1.07	0.93	0.74	0.20	0.20
Canela 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Canela 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Limón 1	1.20	0.61	0.67	0.48	0.00	0.00
Limón 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.20
Limón 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 4. Prueba de habituación deshabitación olfatoria en los distintos tratamientos para generar hiperprolactinemia. Se indican el olor, el periodo de evaluación y cada uno de los tratamientos. El número en cada olor indica el número de presentaciones que se realizaron del olor en particular. Los datos reflejan el tiempo de olfacción en segundos a los olores en la prueba. Se resaltan en negritas los tiempos de olfacción para las primeras presentaciones de cada olor.

Período de Evaluación	Final					
	Grupo	Vehículo		PRL		Sulpirida
	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM	Media(s)	EEM
Olores						
Aceite Mineral 1	3.30	1.29	0.93	0.353	0.80	0.00
Aceite Mineral 2	0.53	0.53	0.00	0.000	0.20	0.20
Canela 1	1.87	0.87	0.27	0.267	0.20	0.20
Canela 2	0.00	0.00	0.00	0.000	0.20	0.20
Canela 3	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00	0.00
Limón 1	0.80	0.40	0.00	0.000	0.60	0.60
Limón 2	0.13	0.13	0.00	0.000	0.00	0.00
Limón 3	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00	0.00

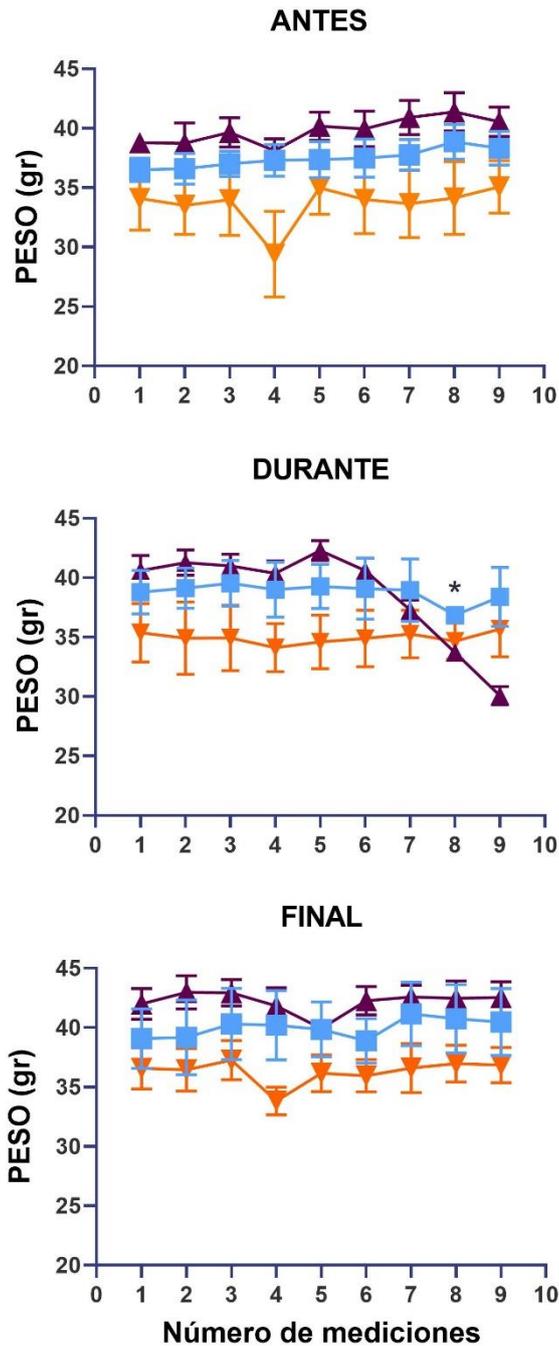
Tabla 4 (continuación). Prueba de habituación deshabituación olfatoria en los distintos tratamientos para generar hiperprolactinemia. Se indican el olor, el periodo de evaluación y cada uno de los tratamientos. El número en cada olor indica el número de presentaciones que se realizaron del olor en particular. Los datos reflejan el tiempo de olfacción a los olores en la prueba. Se resaltan en negritas los tiempos de olfacción para las primeras presentaciones de cada olor. La n=3 para los grupos vehículo y PRL excepto para el grupo sulpirida la cual es n=2.

Evaluación de efectos secundarios generados por el tratamiento

Animales hiperprolactinémicos no presentan cambios en su peso

Con la finalidad de conocer si la hiperprolactinemia generada por ambos tratamientos (PRL y sulpirida) altera el peso corporal y el consumo alimenticio (Auriemma et al., 2018; Garcia-Tornadu et al., 2013; Lopez-Vicchi et al., 2020; Luque et al., 2016; Macotella et al., 2020), se monitoreó su peso antes de iniciar el tratamiento, durante el tratamiento (para valorar un posible efecto a corto plazo), y tras haber finalizado los respectivos tratamientos (para valorar un posible efecto a largo plazo). Se aplicó un análisis de efectos mixtos, asumiendo que los datos no tienen esfericidad, con una corrección de Geisser-Greenhouse. Se tomaron como factores fijos: día de pesaje y grupo.

En los periodos de evaluación, antes y durante, el principal efecto es debido al día de pesaje (antes ($F_{(3.0, 15)} = 23$, $p < 0.0001$), durante ($F_{(2.4, 12)} = 12$, $p = 0.0008$)) y en el periodo de evaluación final este factor no tuvo efecto ($F_{(1.4, 7.0)} = 3.5$, $p = 0.9991$). En ninguno de los periodos de evaluación el factor grupo tuvo efecto (antes ($F_{(2, 5)} = 3.2$, $p = 0.1299$), durante ($F_{(2, 5)} = 1.5$, $p = 0.3162$), final ($F_{(2, 5)} = 1.9$, $p = 0.2449$). Todos los grupos mostraron interacción significativa de factores (antes ($F_{(16, 40)} = 5.9$, $p < 0.0001$), durante ($F_{(16, 40)} = 11$, $p < 0.0001$), final ($F_{(16, 40)} = 2.0$, $p < 0.0001$). Visualmente se observa un consistente decaimiento en el peso del grupo PRL tras la quinta medición durante el periodo de inyecciones, no siendo así con el resto de los grupos (ver fig.15).



■ Vehículo

▲ PRL

▼ Sulpirida

Fig. 15 Peso de animales tratados por 14 días ya sea con PRL o sulpirida para generar hiperprolactinemia. Cada una de las curvas en las diferentes gráficas indica un grupo, en azul claro está representado el grupo vehículo, en morado el grupo PRL y en naranja el grupo sulpirida. En el eje x se indican el número de mediciones que se realizaron y en el eje y, el peso en gramos (g) de cada grupo. En la parte superior de cada gráfica se indica cada uno de los periodos en los cuales se realizaron las mediciones. Solo en el periodo de evaluación, durante, se observan cambios, siendo significativo en la medición ocho para el grupo PRL versus el vehículo. La n=3 para los grupos vehículo y PRL excepto para el grupo sulpirida la cual es n=2. El asterisco indica diferencia significativa para una $p < 0.05$. Los datos están representados como la media \pm EEM (error estándar de la media).

Una hiperprolactinemia generada farmacológicamente modifica el consumo alimenticio de los animales

Para conocer el efecto de una hiperprolactinemia sobre el consumo de alimento de los animales bajo los distintos tratamientos, adicional al monitoreo anterior, se siguió su consumo alimenticio diariamente por grupo (n = 4) registrándose el consumo promedio. Se graficó el consumo de 21 días previo al inicio de las inyecciones, el de 16 días de tratamiento, tomando un día previo y después de haber finalizado las inyecciones, y finalmente, el correspondiente a 22 días después de haber finalizado las inyecciones. Al realizar una prueba Kruskal-Wallis, esta mostró diferencias significativas antes de iniciar los tratamientos ($H(2) = 9.4, p = 0.0093$). Luego de aplicar una prueba post-hoc de Dunns, esta arrojó una diferencia significativa entre los grupos PRL y sulpirida (vehículo (31 ± 3.6 g), PRL (34 ± 3.8 g), sulpirida (22 ± 3.0 g), $z = 2.9, p = 0.0121$). Durante, la prueba Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas ($H(2) = 19, p < 0.0001$) y una prueba post-hoc de Dunns, evidenció la diferencia entre el grupo vehículo vs. sulpirida (28 ± 4.1 g vs. 14 ± 0.77 g, $z = 3.6, p = 0.0010$) y PRL vs. sulpirida (24 ± 2.3 g vs. 14 ± 0.77 g, $z = 3.9, p = 0.0003$). Este efecto se mantiene en el periodo de evaluación final ($H(2) = 18, p = 0.0002$), siendo el grupo sulpirida el que presenta la disminución de consumo de alimento respecto al resto de los grupos (vehículo vs. sulpirida (39 ± 3.9 g vs. 21 ± 1.5 g), $z = 3.7, p = 0.0006$; PRL vs. sulpirida (39 ± 4.3 g vs. 21 ± 1.5 , $z = 3.5, p = 0.0013$). Solo el grupo sulpirida presenta cambios en su consumo en los distintos periodos de evaluación (ver fig.16).

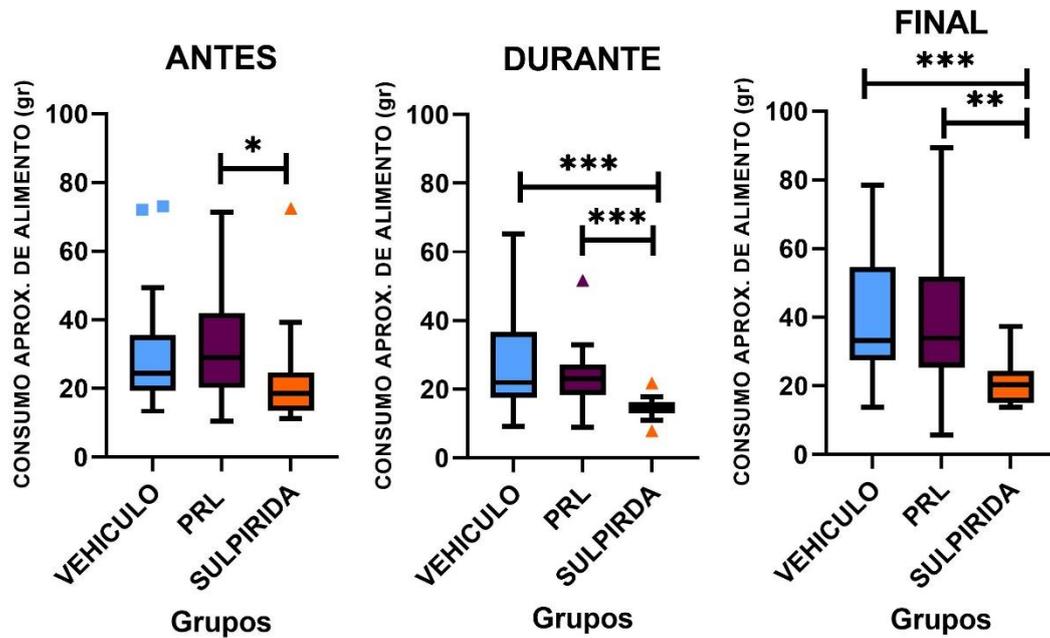


Fig. 16 Consumo de alimento de animales tratados con PRL y sulpirida durante 14 días para generar hiperprolactinemia. En el eje x, se indica cada uno de los grupos comparados: vehículo, PRL y sulpirida. En el eje y, se indica el consumo aproximado de alimento en gramos para un grupo de 4 animales. Los títulos en la parte superior de cada gráfica indican los periodos de evaluación en los cuales se realizaron los pesajes. Las barras con asteriscos indican las comparaciones que mostraron diferencias para una $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ ** y $p < 0.0005$ ***. Los datos son representados como cajas de Tukey. La $n = 21$, $n = 16$ y $n = 22$ corresponde para los periodos de evaluación antes, durante y final, respectivamente.

Dado que no se observaron de manera cualitativa cambios en el despliegue conductual de los diferentes tratamientos para generar hiperprolactinemia, se continuaron los experimentos haciendo uso del fármaco sulpirida.

Experimento 2

La detección olfatoria en ratones macho se mantiene en un estado de hiperprolactinemia

Para conocer si un estado de hiperprolactinemia modifica la detección olfatoria de ratones macho adultos, se realizó la prueba conductual de alimento escondido.

Antes de aplicar una prueba estadística, se realizó la detección de valores atípicos por el método ROUT. Para la fase visual de esta prueba se detectaron nueve valores atípicos en los diferentes periodos de evaluación de los tratamientos. Se aplicó un análisis de efectos mixtos, asumiendo que los datos

no tienen esfericidad, con una corrección de Geisser-Greenhouse. Se tomaron como efectos fijos el periodo de evaluación y el grupo experimental.

Tanto para la fase visible como la fase donde el alimento está escondido, el principal efecto en la disminución en la latencia para descubrir el alimento, fue debido al periodo de evaluación (visual, ($F_{(1.9, 153)} = 3.4, p = 0.0369$), escondido ($F_{(1.7, 90)} = 20, p < 0.0001$)), no hubo efecto debido al grupo (visual ($F_{(2, 159)} = 1.6, p = 0.2142$), escondido ($F_{(2, 56)} = 0.8, p = 0.4564$)). Solo en la fase visual se presentó interacción entre los factores (visual ($F_{(4, 159)} = 3, p = 0.0218$), escondido ($F_{(4, 106)} = 0.54, p = 0.7063$)) (ver fig. 17).

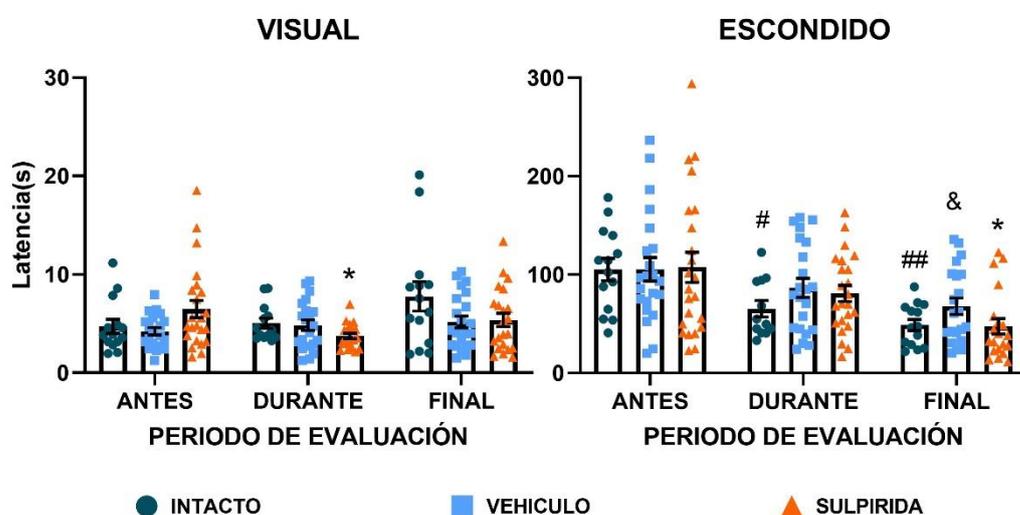


Fig. 17 Detección olfatoria en animales tratados con sulpirida. Se indica en la parte superior de cada gráfica la fase de la prueba de alimento escondido: visible y escondido. En el eje x, se indican cada uno de los periodos de evaluación en las cuales se observó el desempeño de los animales en la prueba. En el eje y, se indica la latencia (tiempo para descubrir el alimento) en segundos. Cada punto en las gráficas representa un animal. Los círculos, verde azulado, representan al grupo intacto, los cuadros azul claro, representan el grupo vehículo y los triángulos naranjas, representan al grupo sulpirida. El numeral (#) indica diferencia significativa para el grupo intacto (n = 14), el ampersand (&) para el grupo vehículo (n = 22) y el asterisco (*) para el grupo sulpirida (n = 23) en ambas gráficas. Todas las diferencias que se indican en cada gráfica son respecto al periodo de evaluación antes con el resto de los periodos de evaluación en cada grupo. Los datos son representados como la media \pm EEM. Los símbolos *, #, & son cuando $p < 0.05$ y ## indica una $p < 0.005$.

Los animales evaluados solo muestran una disminución en su latencia para descubrir el alimento en ambas fases debida al periodo de evaluación, lo cual sugiere una mejora debida al número de ensayos, esto pudiera deberse al reforzamiento positivo del estímulo olfatorio (galleta) sobre la conducta de los animales. La sulpirida no afecta la detección olfatoria de los animales.

Animales tratados con sulpirida no muestran preferencia al olor de una hembra receptiva tras una semana de haber finalizado el tratamiento

La evaluación de la preferencia sexual olfatoria que se realizó en los ratones antes de comenzar el tratamiento y realizar una ANOVA de dos vías, mostró que todos los grupos presentan una clara preferencia al estímulo de hembra receptiva (estímulo $F_{(2,144)} = 108$, $p < 0.0001$, hembra (intacto $[88.07 \pm 8.84$ s], vehículo $[79.81 \pm 8.289$ s], sulpirida $[93.05 \pm 8.97$ s]), grupo $F_{(2,144)} = 0.66$, $p = 0.5183$, interacción $F_{(4,144)} = 0.57$, $p = 0.6848$).

Una vez iniciadas las inyecciones, solo el grupo vehículo pierde la preferencia sexual olfatoria mostrada previo al tratamiento, lo cual puede deberse al número de inyecciones realizadas hasta ese momento, ya que el grupo intacto y el grupo sulpirida mantienen la conducta de preferencia sexual olfatoria (estímulo $F_{(2,138)} = 38$, $p < 0.0001$, (limpio (intacto $[12.78 \pm 1.58$ s], vehículo $[11.07 \pm 1.24$ s], sulpirida $[12.22 \pm 1.22$ s]); macho (intacto $[27.80 \pm 5.06$ s], vehículo $[17.70 \pm 2.34$ s], sulpirida $[20.50 \pm 2.77$ s]); hembra (intacto $[55.04 \pm 9.60$ s], vehículo $[28.30 \pm 4.14$ s], sulpirida $[33.91 \pm 4.39$ s]), grupo $F_{(2,138)} = 7.4$, $p = 0.0009$, interacción $F_{(4,138)} = 2.5$, $p = 0.0431$).

Una vez finalizado el tratamiento se observó que el grupo sulpirida no mostró una clara preferencia olfatoria hacia el olor de hembra receptiva comparado con el grupo intacto y el grupo vehículo (estímulo $F_{(2,138)} = 36$, $p < 0.0001$, (limpio (intacto $[9.20 \pm 0.97$ s], vehículo $[9.31 \pm 1.02$ s], sulpirida $[9.45 \pm 0.91$ s]); macho (intacto $[25.11 \pm 3.70$ s], vehículo $[19.22 \pm 2.50$ s], sulpirida $[19.92 \pm 2.82$ s]); hembra (intacto $[53.47 \pm 11.35$ s], vehículo $[41.30 \pm 7.11$ s], sulpirida $[27.74 \pm 4.31$ s])), grupo $F_{(2,138)} = 3.5$, $p = 0.0322$, interacción $F_{(4,138)} = 2.3$, $p = 0.0600$) (ver fig. 18).

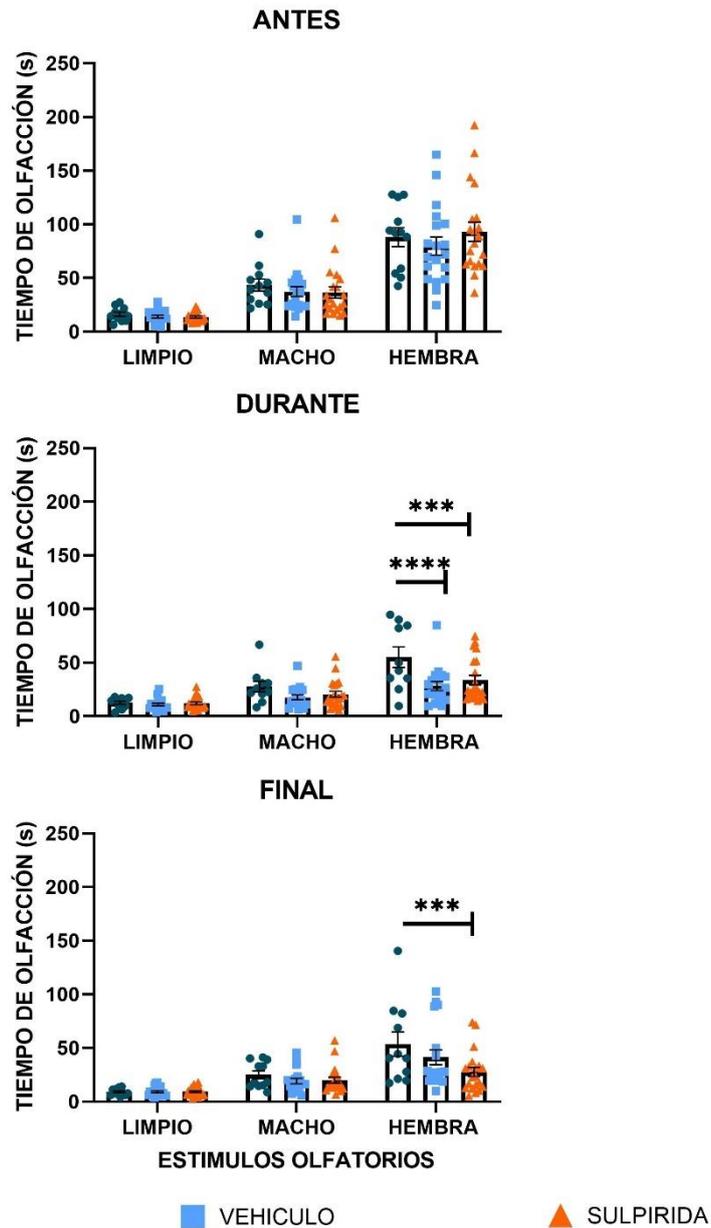


Fig. 18 Preferencia sexual olfatoria en animales tratados con sulpirida. En el título de cada gráfica se indica el periodo de evaluación al cual corresponde la prueba. En el eje x, se señalan los estímulos a los que fueron expuestos los animales simultáneamente. El eje y, indica el tiempo de olfacción en segundos a cada uno de los estímulos olfatorios. En la parte inferior de las gráficas se indica el color y la figura geométrica que representa a cada grupo: círculo - verde azulado, grupo intacto, cuadrado-azul claro, grupo vehículo, triángulo-naranja, grupo sulpirida. Cada figura geométrica en las gráficas representa un animal evaluado. Los asteriscos indican diferencia significativa en el tiempo de olfacción para el estímulo hembra receptiva entre grupos. Los datos son representados como la media \pm EEM. El número de animales es de 11, para el grupo intacto, 18 para el grupo vehículo y 20 para el sulpirida. El símbolo *** indica una $p < 0.0005$, **** indica una $p < 0.00005$.

Tras el segundo ensayo se observa una disminución general de los tiempos de olfacción siendo significativa en el estímulo de hembra receptiva, lo cual influye

en la preferencia sexual olfatoria de los ratones macho viéndose modificada tras iniciar el tratamiento con sulpirida y pérdida tras una semana de haber finalizado en el grupo sulpirida.

El patrón de habituación-deshabitación olfatoria se modifica independientemente del tratamiento mostrando una consistente disminución en el tiempo de olfacción

Antes de comenzar el periodo de inyecciones los animales muestran un claro patrón de habituación-deshabitación (ver fig. 19), sin embargo, su desempeño en la prueba se ve mermado en los siguientes ensayos.

Al evaluar a los ratones, tomando en cuenta el tiempo de investigación, el índice de habituación y el índice de discriminación antes del tratamiento, y tras aplicar una ANOVA de una vía no se observaron diferencias entre los grupos para el tiempo de investigación ($F_{(2, 43)} = 1.4$, $p = 0.2691$), lo mismo ocurrió para el índice de habituación ($H(2) = 0.29$, $p = 0.8664$) y para el índice de discriminación ($H(2) = 2.4$, $p = 0.3033$).

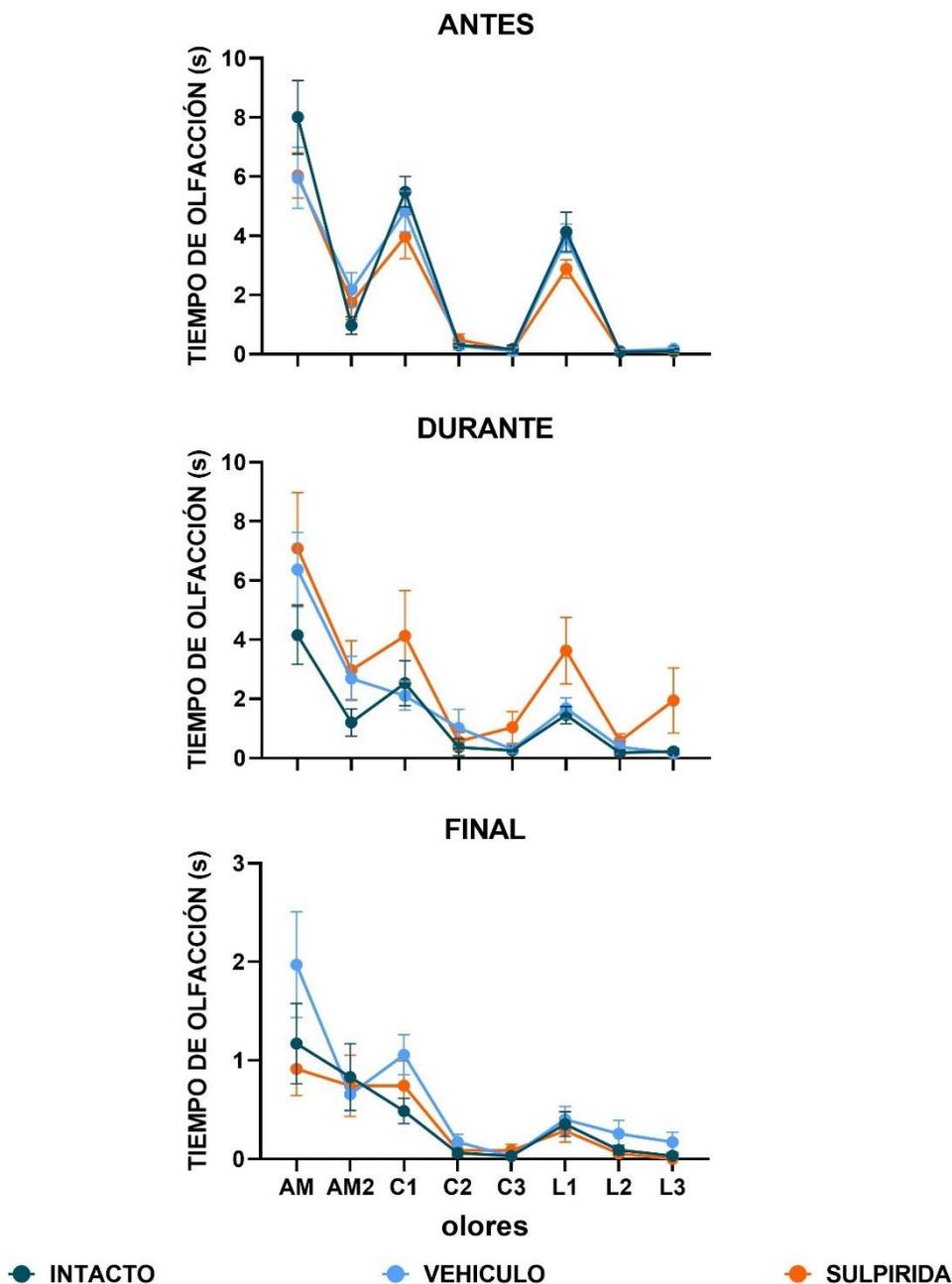


Fig. 19 Patrón de conducta en la prueba habituación-deshabitación en ratones macho tratados con sulpirida. Se presentan los patrones de conducta observados en los distintos periodos de evaluación, indicados en la parte superior de cada gráfica. En el periodo de evaluación, antes, se muestra el patrón conductual esperado en la prueba en el que se observa mayor tiempo de olfacción en las primeras presentaciones de cada olor y una disminución progresiva en el tiempo de olfacción en las siguientes presentaciones del mismo olor. En el eje x, se señalan con letras los olores a los que fueron expuestos los animales evaluados: AM, aceite mineral, C, canela y L, limón. Los números indican el número de repeticiones del olor que se realizaron. El eje y, indica el tiempo de olfacción en segundos para cada olor. Las leyendas de la parte inferior de la gráfica indican el color de la curva para cada grupo: verde azulado para el grupo intacto, azul claro para el grupo vehículo y naranja para el grupo sulpirida. Todos los datos son representados como la media \pm EEM. Para el grupo intacto la n = 13, para el grupo vehículo n = 16, para el grupo sulpirida n = 15.

En el periodo de evaluación que se realizó durante el tratamiento, y tras aplicar

una prueba Kruskal-Wallis, los grupos no mostraron diferencias significativas para ninguno de los indicadores (tiempo de investigación ($H(2) = 3.4$, $p = 0.1848$), índice de habituación ($H(2) = 3.5$, $p = 0.1711$), índice de discriminación ($H(2) = 0.81$, $p = 0.6686$). Sin embargo, en la fig. 21A y en la fig. 21B, en las gráficas que corresponden a este periodo de evaluación (durante), se observa que el grupo sulpirida destaca respecto al resto de los grupos.

Nuevamente, no se observan diferencias en ninguno de los grupos en el periodo de evaluación final, después de una semana de haber finalizado el tratamiento, y aplicar una prueba de Kruskal-Wallis (tiempo de investigación ($H(2) = 3.8$, $p = 0.1529$), índice de habituación ($H(2) = 0.57$, $p = 0.7538$), índice de discriminación ($H(2) = 2.7$, $p = 0.2593$). Destacan en las gráficas correspondientes a este último periodo de evaluación una disminución consistente en el tiempo de investigación, reflejándose en su patrón de conducta (ver fig. 19) y sus respectivos índices (ver fig. 20).

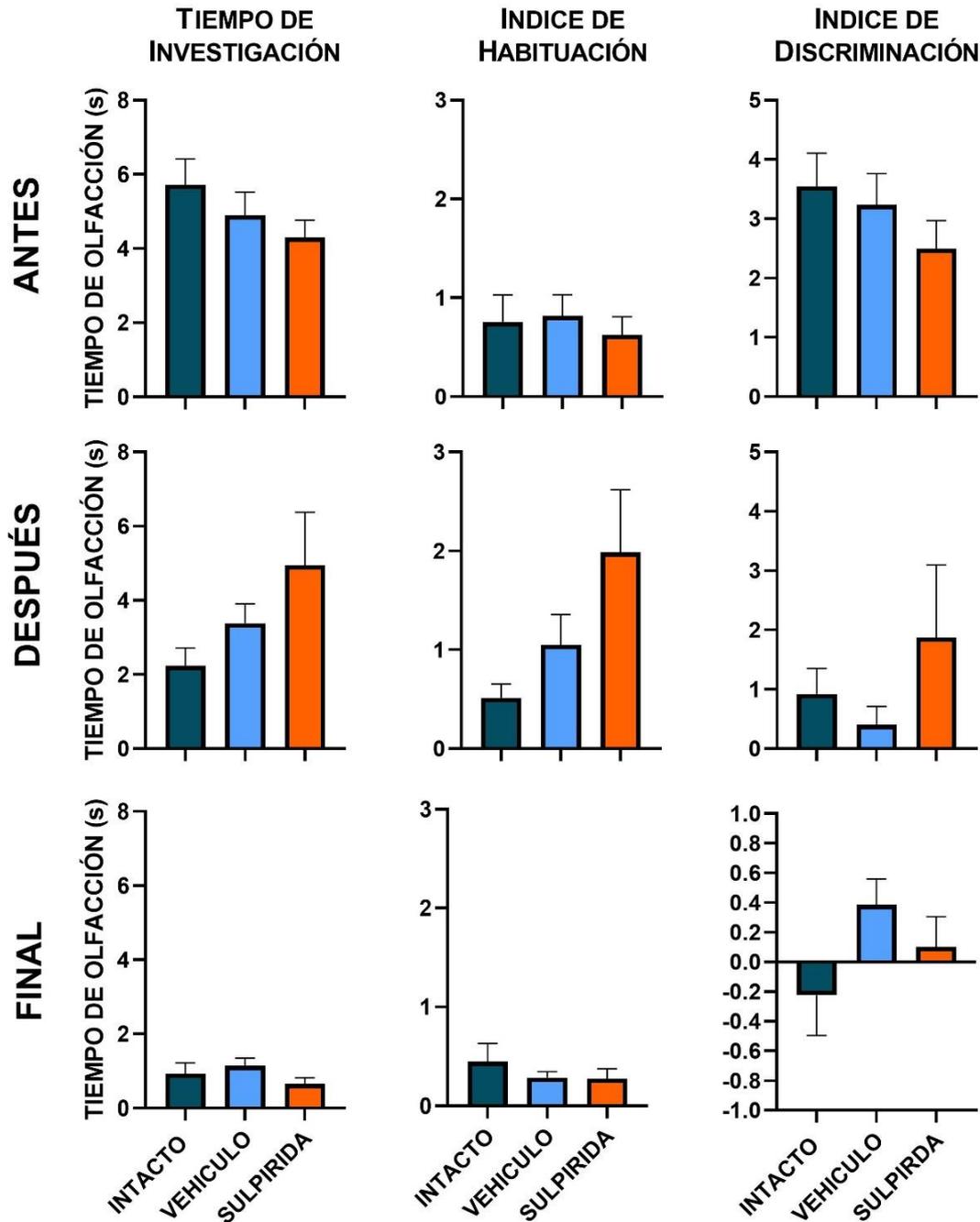


Fig. 20 Prueba de habituación-deshabitación en ratones macho tratados con sulpirida. A la izquierda de cada set de gráficas se indica el periodo de evaluación al que corresponden. Las primeras tres gráficas, tiempo de investigación, índice de habituación e índice de discriminación corresponden al periodo de evaluación, antes, las siguientes tres al periodo de evaluación, durante, y las últimas tres al periodo de evaluación final. De izquierda a derecha se presentan las gráficas que se refieren al tiempo de investigación, índice de habituación e índice de discriminación. En el eje y de las gráficas que corresponden al tiempo de investigación se indica el tiempo en segundos. Solo en las gráficas inferiores se indican los grupos a los que corresponden cada una de las barras. Todos los datos son representados como la media \pm EEM. Para el grupo intacto la $n = 13$, para el grupo vehículo $n = 16$, para el grupo sulpirida $n = 15$.

Dado a que se observa una clara disminución en el tiempo de olfacción en los periodos de evaluación siguientes (durante y final), se pensó que podría deberse al número de ensayos. Por lo cual, para descartar que esta disminución fuera debido a la pérdida de novedad del estímulo, en los últimos lotes de animales a tratar, se cambió la pareja de olores usados en la prueba de habituación-deshabitación, empleando en el periodo de evaluación durante los olores vainilla/vinagre y manteniendo la combinación inicial (canela-limón) en los periodos de evaluación restantes. Sin embargo, a pesar de haber realizado esta alternancia de olores no se observan diferencias en el patrón de conducta de los animales (ver fig. 21).

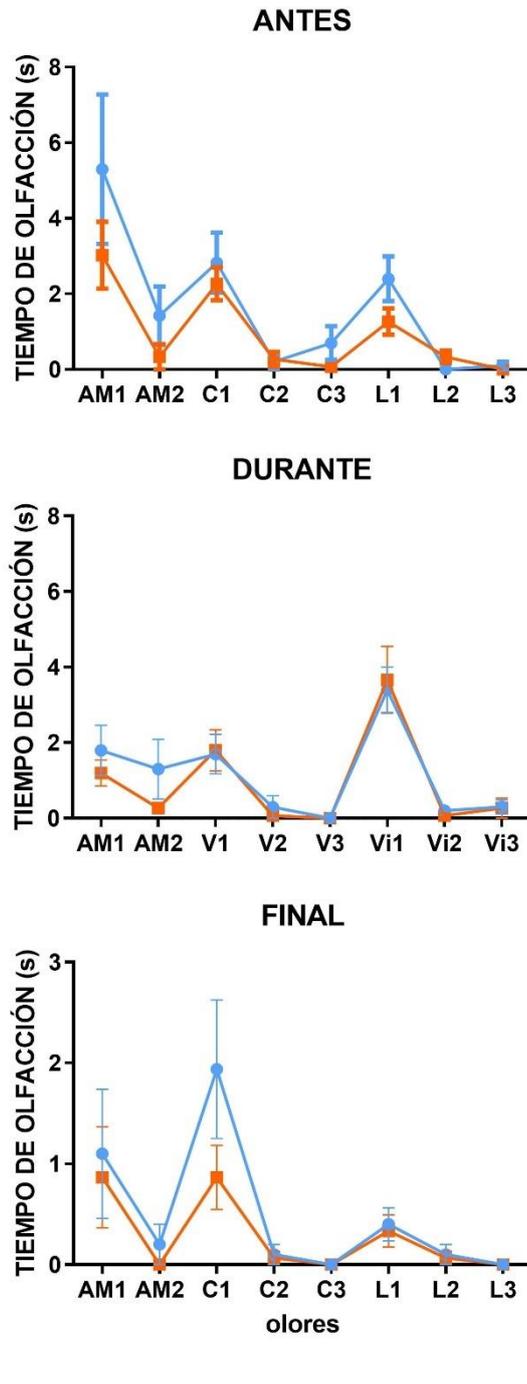


Fig. 21 Patrón conductual en animales tratados con sulpirida no está influenciado por el número de exposiciones al mismo odorante. A. Se presentan los patrones de conducta observados en los distintos periodos de evaluación, indicados en la parte superior de cada gráfica. El patrón conductual que presentaron los animales fue similar en ambos grupos durante periodos de evaluación. En el eje x, se señalan con letras los olores a los que fueron expuestos los animales evaluados: AM, aceite mineral, C, canela, L, limón, V, vainilla, Vi, Vinagre. Los números indican el número de repeticiones del olor que se realizaron. El eje y, indica el tiempo de olfacción en segundos para cada olor. Las leyendas en la parte inferior de las gráficas indican el color de la curva para cada grupo: azul claro para el grupo vehículo y naranja para el grupo sulpirida. Los datos son representados como la media \pm EEM. Para el grupo vehículo $n = 4$, para el grupo sulpirida $n = 6$.

Al realizar una prueba U de Mann-Whitney, para los indicadores en el periodo de evaluación antes, no arrojó diferencias (tiempo de investigación, $U = 7$, $p = 0.3524$; índice de habituación, $U = 6$, $p = 0.2381$; índice de discriminación, $U = 10$, $p = 0.7476$) de igual manera ocurrió para el periodo de evaluación durante (tiempo de investigación, $U = 11$, $p = 0.8571$; índice de habituación, $U = 6.5$, $p = 0.2810$; índice de discriminación, $U = 10$, $p = 0.7238$) y final (tiempo de investigación, $U = 7.5$, $p = 0.3857$; índice de habituación, $U = 9$, $p = 0.4000$; índice de discriminación, $U = 8$, $p = 0.4476$). Lo cual indica que el efecto visto anteriormente no está relacionado con el número de veces que se le presente la misma combinación de odorantes (ver fig. 22).

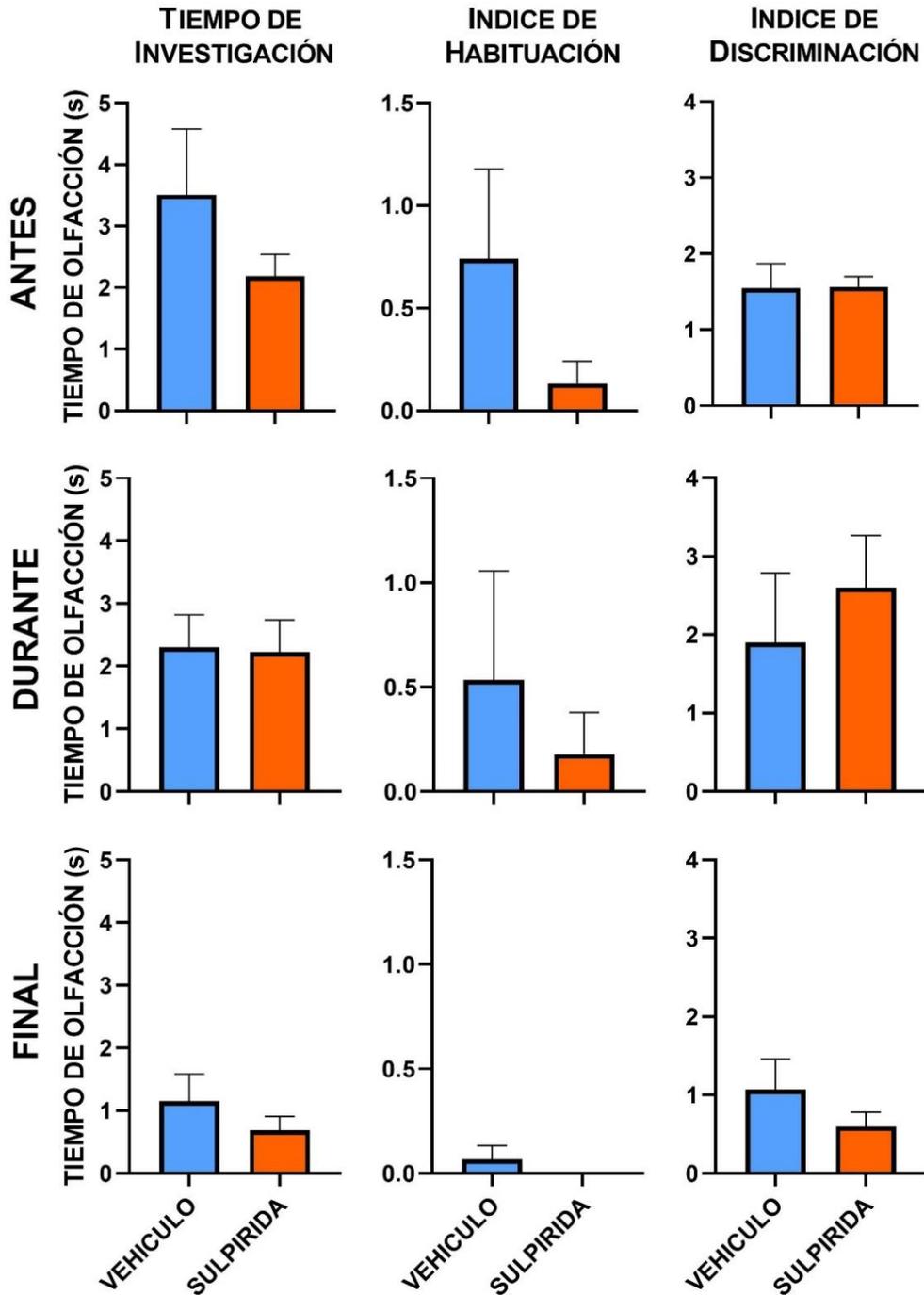


Fig. 22 El desempeño olfatorio en animales tratados con sulpirida no está influenciado por el número de exposiciones al mismo olor. A la izquierda de cada set de gráficas se indica el periodo de evaluación al que corresponden. Las primeras tres gráficas, tiempo de investigación, índice de habituación e índice de discriminación corresponden al periodo de evaluación, antes, las siguientes tres al periodo de evaluación, durante, y las últimas tres al periodo de evaluación final. De izquierda a derecha se presentan las gráficas que se refieren al tiempo de investigación, índice de habituación e índice de discriminación. El eje y de las gráficas que corresponden al tiempo de investigación se indica el tiempo en segundos. Solo en las gráficas inferiores se indican los grupos a los que corresponden cada una de las barras. Los datos son representados como la media \pm EEM. Para el grupo vehículo $n = 4$, para el grupo sulpirida $n = 6$.

Dado que las pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas en ninguno de los índices evaluados y en el último grupo el patrón de conducta olfatoria se mantiene independientemente de los estímulos empleados sugiere que las regiones centrales de procesamiento olfatorio no se ven afectadas por la hiperprolactinemia.

La capacidad motora de ratones tratados con sulpirida por 14 días no se ve afectada

Debido a que se empleó sulpirida, un antagonista dopaminérgico para los receptores D2 y dado que estos receptores están involucrados en el control motor (Zhang et al., 2019), se realizó una prueba de campo abierto para descartar efectos en la capacidad motora espontánea que pudieran afectar a su vez el desempeño de los animales en las pruebas olfatorias (p. e. alimento escondido). Se comparó la distancia total recorrida por los grupos en los distintos periodos de evaluación. Antes del tratamiento, tras realizar una ANOVA de dos vías, no se muestra diferencias significativas en la distancia total recorrida (número de muestreos ($F_{(11, 242)} = 15$, $p = 0.0001$), grupo ($F_{(1, 22)} = 0.11$, $p = 0.7462$), interacción ($F_{(11, 242)} = 1.3$, $p = 0.2445$). De igual forma, para el periodo evaluación realizado durante el tratamiento no se observaron diferencias significativas en la distancia total que recorrieron los ratones (número de muestreos ($F_{(11, 242)} = 3.7$, $p < 0.0001$), grupo ($F_{(1, 22)} = 0.58$, $p < 0.4538$), interacción ($F_{(11, 242)} = 0.48$, $p = 0.9170$) y final (número de nuestros ($F_{(11, 242)} = 0.97$, $p = 0.4790$), grupo ($F_{(1, 22)} = 2.1$, $p = 0.1590$), interacción ($F_{(11, 242)} = 3.8$, $p < 0.0001$)) (ver fig. 23).

Adicional al parámetro anterior (distancia total), se tomaron en cuenta otros parámetros como distancia total al margen, actividad horizontal y episodios de actividad estereotípica (datos no incluidos) y dado que de igual forma no se observaron diferencias significativas se descartó por completo cualquier otra alteración asociada con la función motora de los animales. Por lo cual se puede concluir que el tratamiento con sulpirida no altera la función motora de los animales.

Animales tratados con sulpirida presentan variaciones de peso y consumo de alimento tras haber finalizado los tratamientos

Tras haber realizado un análisis de efectos mixtos con una corrección de Geisser-Greenhouse's, asumiendo que los datos no tienen esfericidad y tomando como efectos fijos, el día de pesaje y el grupo, este no arrojó diferencias entre los grupos antes de iniciar el tratamiento (día de pesaje ($F_{(5.1, 295)} = 4.7$, $p = 0.0004$), grupo ($F_{(2,59)} = 0.53$, $p = 0.5936$), interacción ($F_{(16,467)} = 1.8$, $p = 0.0323$)), durante el tratamiento se mantuvo este comportamiento (día de pesaje ($F_{(6, 348)} = 2.1$, $p = 0.0563$), grupo ($F_{(2,59)} = 1.3$, $p = 0.2899$), interacción ($F_{(16,467)} = 0.62$, $p = 0.8669$), sin embargo, al finalizar el tratamiento se observa efecto sobre el peso de los animales debido al grupo (día de pesaje ($F_{(5.9, 329)} = 0.48$, $p = 0.8197$), grupo (intacto [41 ± 0.12 g], vehículo [39 ± 0.12 g], sulpirida [38 ± 0.065 g]; $F_{(2,57)} = 3.8$, $p = 0.0294$), interacción ($F_{(16,444)} = 0.37$, $p = 0.9884$). Al realizar una prueba post hoc de Tukey este arrojó que las diferencias se presentan entre el grupo intacto y sulpirida solo en días específicos (ver fig. 24).

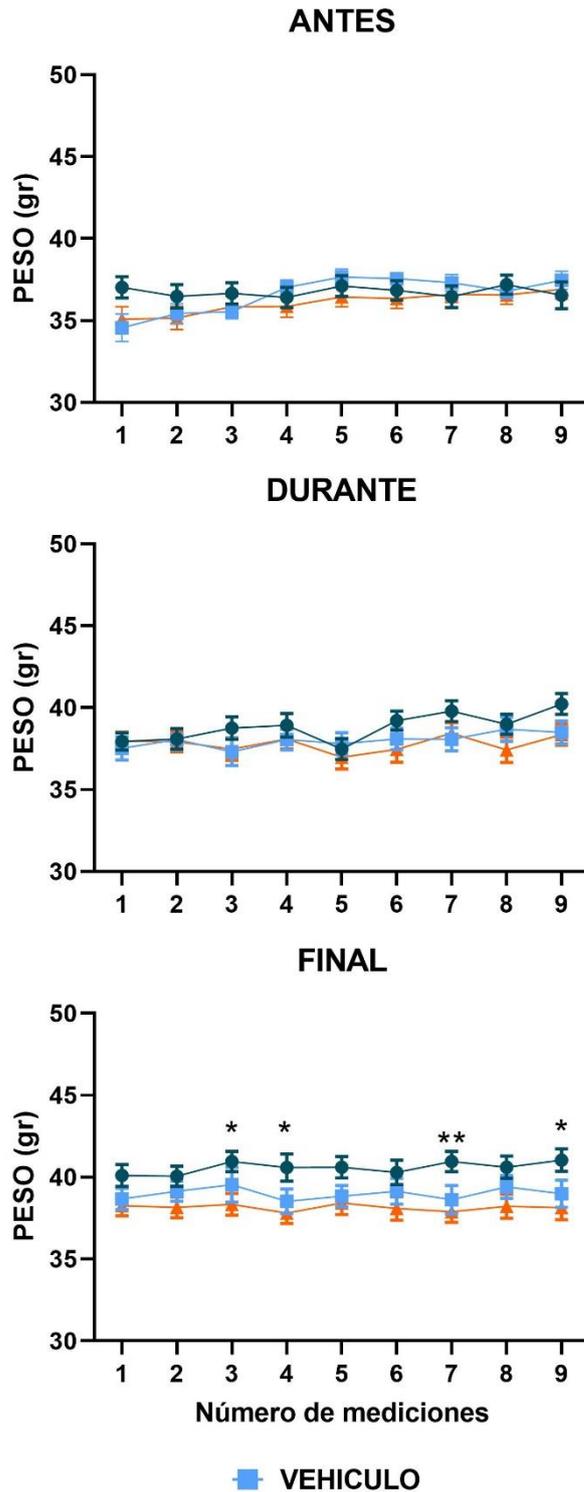


Fig. 24 Efecto del tratamiento de sulpirida sobre el peso de los animales. En cada una de las gráficas, en la parte superior, se indica el periodo de evaluación al cual corresponden las mediciones. En el eje x, se indican el número de mediciones que se realizaron en cada periodo. En el eje y, se indica el peso en gramos (g) de cada grupo. En la parte inferior de la figura se indican los colores que representan a cada grupo verde azulado para el grupo intacto, azul claro para el grupo vehículo y naranja para el grupo sulpirida. Los datos son representados como la media \pm EEM. Los asteriscos indica diferencia significativa. Intacto, n = 14, vehículo, n = 23 y sulpirida n = 23.

Para determinar el consumo de alimento que tuvieron los ratones tratados con sulpirida, se tomó el consumo aproximado de alimento de 4 animales alojados en la misma caja. Nuevamente se aplicó el método ROUT para la detección de valores atípicos. Tras realizar una prueba Kruskal-Wallis, esta no mostró diferencia en el consumo aproximado de alimento antes de comenzar el tratamiento ($H(2) = 4.2, p = 0.1255$) ni durante el tratamiento ($H(2) = 0.71, p = 0.7018$), sin embargo, una vez finalizado se evidenció una diferencia significativa (intacto [27 ± 1.6 g], vehículo [23 ± 0.74 g], sulpirida [27 ± 0.99 g]; $H(2) = 6.9, p = 0.0312$) y tras realizar una post-hoc de Dunns se encontró diferencia significativa para la comparación vehículo vs. sulpirida (vehículo [23 ± 0.74 g] vs. sulpirida [27 ± 0.99 g], $z = 2.6, p = 0.0271$) (ver fig.25).

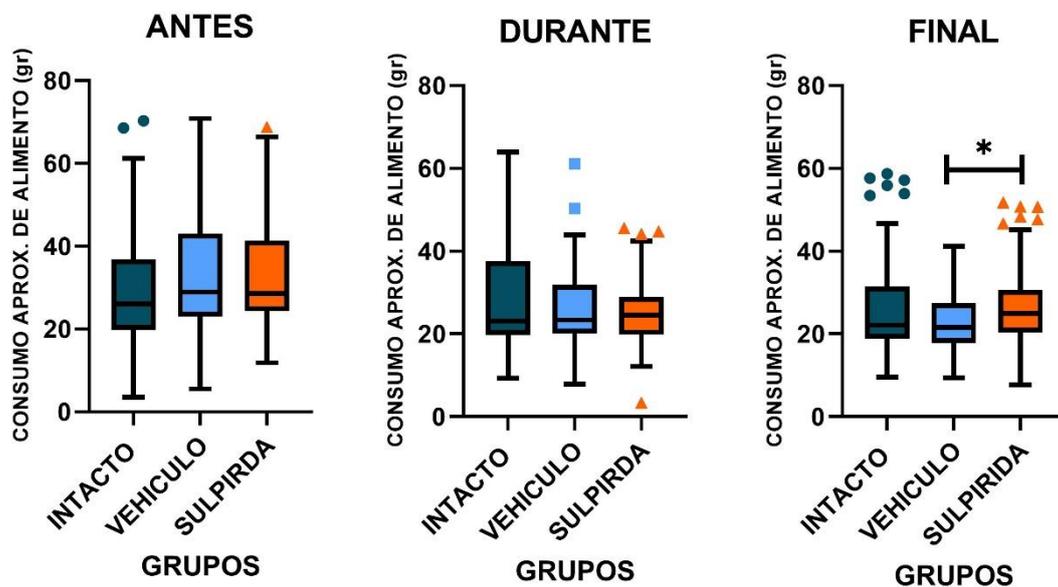


Fig. 25 Consumo de alimento en cada uno de los periodos de evaluación. En la parte superior de cada gráfica se indica el periodo de evaluación. En el eje x, se señala cada uno de los grupos evaluados. En el eje y, se indica el consumo aproximado de alimento en gramos (g) acumulado de todos los animales que fueron distribuidos en cada grupo. Los círculos, cuadrados y triángulos que sobresalen de cada caja representan valores atípicos. El asterisco denota una diferencia significativa entre los grupos comparados para una $p < 0.05$. Los datos son representados como la media \pm EEM. La $n = 21$, $n = 16$ y $n = 22$ corresponde para los periodos de evaluación antes, durante y final, respectivamente.

La evidencia obtenida del monitoreo del peso y consumo de alimento sugiere que el metabolismo de los animales es estable durante el tratamiento, sin embargo, tras haber finalizado el tratamiento se observan variaciones en su peso

a lo largo del tiempo siendo menor el peso de los animales tratados con sulpirida respecto al grupo intacto coincidiendo con un aumento del consumo alimenticio lo cual sugiere efectos a largo plazo sobre el metabolismo de los animales.

Discusión

El principal interés del presente trabajo fue evidenciar las alteraciones olfatorias que presentan ratones macho en un estado de hiperprolactinemia. Para evaluar la función olfatoria de estos animales se utilizó una batería de pruebas conductuales olfatorias (leer metodología para más detalles), cuyo uso nos permitió valorar diferentes aspectos de la capacidad olfatoria (detección, identificación, memoria y discriminación de estímulos) que posiblemente se vean afectados debido a la elevación sistémica de la PRL, dada por los tratamientos. Adicionalmente, esta valoración permite identificar las posibles estructuras cerebrales que pudieran verse afectadas por el tratamiento, ya que dependiendo de la prueba olfatoria hay una participación predominante de estructuras cerebrales específicas. La caracterización conductual del modelo de hiperprolactinemia es la principal fortaleza de este trabajo pues se presenta una visión amplia del funcionamiento olfatorio empleando estímulos tanto fisiológicamente relevantes como generales. En el presente trabajo se realizó una comparación inicial de los efectos de la administración exógena de la hormona PRL (5 mg/kg) y el uso del fármaco sulpirida (50 mg/kg) para incrementar los niveles de PRL, con la finalidad de conocer si se producían efectos diferenciales sobre la conducta olfatoria de los ratones macho. Dado que la evidencia conductual no arrojó diferencias claras entre los tratamientos, observándose en los ratones una conducta olfatoria similar independientemente del tratamiento, se continuó el resto del experimento con el uso del fármaco sulpirida. Sin embargo, para reforzar este resultado se requiere al menos duplicar el número de animales bajo los distintos tratamientos.

La dosis utilizada para el tratamiento con sulpirida se determinó tras realizar una curva dosis respuesta y observar que 50 mg/kg promueve el incremento esperado en los niveles de expresión del mRNA tanto de *Prl* como de *Prlr* en la hipófisis, sugiriendo una mayor producción de la hormona. Los principales estudios en los cuales se ha empleado el fármaco sulpirida, a una dosis similar

o cercana a la empleada en esta tesis (50 mg/kg), han sido enfocados al estudio de las alteraciones metabólicas y reproductivas generadas por el uso prolongado de este fármaco tanto en machos como en hembras (*Ahmadi & Ahmadi, 2016; Martín-López & Navarro, 1996; Mostafapour et al., 2014*), reportando elevaciones de PRL a partir de una dosis de 20 mg/kg. Esto último es relevante ya que no se sabe qué dosis de sulpirida promueve una elevación consistente de PRL a lo largo del tiempo. Los efectos reportados con el uso de este fármaco han mostrado ser dosis dependientes (*Martín-López & Navarro, 1996; Mostafapour et al., 2014*).

La duración de los tratamientos con el fármaco sulpirida es variable en los diferentes estudios siendo el más corto de 9 días (*Ahmadi & Ahmadi, 2016; Martín-López & Navarro, 1996; Mostafapour et al., 2014*). En el presente trabajo, la sulpirida fue administrada durante 14 días con el objetivo de generar un estado de hiperprolactinemia. Sin embargo, desconocemos si el comportamiento de la elevación de los niveles de PRL sea consistente a lo largo de este periodo, por lo que sería necesario medir los niveles en suero de los grupos en los distintos periodos de evaluación. Por otro lado, si bien existe evidencia que demuestra la presencia del PRLR en regiones relevantes para la función olfatoria (BO y CO), se desconoce la funcionalidad del receptor y/o la afinidad del receptor a la hormona en estas regiones.

Se ha demostrado, mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratones macho, que la administración exógena de PRL a una dosis de 5 mg/kg promueve la expresión de pSTAT5, un evento clave en la cascada de señalización Jak / STAT, en regiones cerebrales específicas en las que se encuentra el PRLR (núcleos del hipotálamo preóptico, anterior y tuberal, así como en el núcleo septofimbrial o amígdala medial posterodorsal del telencéfalo). Ninguna de las regiones en las que se observó la presencia del PRLR ha sido exclusiva del ratón macho (*Salas-López et al., 2018*). Adicionalmente, *Drago y Lissandrello (2000)* mostraron que esta misma dosis de PRL promovió una mejora en la conducta de acicalamiento inducida por novedad y en la conducta sexual, esto último siendo observable tanto en animales con un desempeño normal como con un pobre desempeño, restaurando por completo el patrón sexual.

Las principales alteraciones producidas por una hiperprolactinemia inciden sobre la función reproductiva. En estudios en los cuales se evalúa la conducta sexual, una dosis de 5 mg/kg, que fue la empleada en esta tesis, genera una disminución de la conducta sexual e inhibición de los reflejos sexuales, alteraciones características de una hiperprolactinemia en machos (Cruz-Casallas et al., 1999; Rehman et al., 2000). En el presente trabajo observamos que los machos bajo los distintos tratamientos, a diferencia de los machos control, no mostraron una preferencia hacia el olor de hembra receptiva en la prueba POT, prueba que implica la identificación, detección y preferencia por una hembra receptiva. Dado que la identificación de una posible pareja es importante para la posible interacción sexual, lo observado en la prueba POT, es consistente con lo reportado en la literatura en donde, tras generar una hiperprolactinemia, se observa una pérdida en la capacidad para identificar un conoespecífico del sexo opuesto (Cruz-Casallas et al., 1999; Rehman et al., 2000).

Dado que la PRL accede al cerebro por mecanismos de transporte activo (Brown et al., 2011; Cruz-Casallas et al., 1999), puede tomar hasta 5 días para que esta proteína alcance concentraciones óptimas en el cerebro y jugar su papel sobre el comportamiento en un animal hiperprolactinémico (Cruz-Casallas et al., 1999). Debido a lo anterior se comenzaron las pruebas olfatorias en el periodo de evaluación durante el tratamiento después del quinto día de inyección.

Inicialmente, en el grupo *piloto o experimento 1 (vehículo vs. PRL vs. sulpirida)*, se observó que los grupos PRL y sulpirida no presentan el patrón de conducta esperado tras haber iniciado el tratamiento en la prueba PHD, respecto al grupo vehículo. Sin embargo, esto no ocurre en el *experimento 2 (intacto vs. vehículo vs. sulpirida)* donde el desempeño de los animales de todos los grupos evaluados es similar. Por otra parte, el desempeño de los animales en la prueba PAE es consistente en ambos experimentos.

En el experimento 1, en la fase visual de la prueba PAE tras haber iniciado el tratamiento, se observa un aumento en la latencia para descubrir el alimento en el tratamiento con PRL, lo cual pudiera ser debido a afecciones relacionadas con la visión. Un efecto similar se observa en el experimento 2, con el tratamiento sulpirida, en el cual nuevamente en la fase visible de la prueba PAE, se observa un aumento en la latencia para descubrir el alimento en el periodo de evaluación,

sin embargo, en esta ocasión este fenómeno no está relacionado con el tratamiento. En la fase no visible (alimento escondido) de la prueba PAE, en ambos tratamientos, los ratones evaluados muestran una disminución de la latencia para descubrir el alimento tras el primer ensayo de la prueba. Este efecto pudiera deberse al reforzamiento positivo de la galleta sobre la conducta del animal (Hutch et al., 2015; Le Pichon et al., 2009), ya que se sabe que las neuronas AgRP, las cuales se localizan en el hipotálamo y son activadas por la privación de alimento (Chen et al., 2015; Garrison & Knight, 2017), pueden promover la actividad locomotora favoreciendo la búsqueda de alimento (Padilla et al., 2016). En la prueba PAE se descarta que la disminución de la latencia para descubrir el alimento sea debido a una mayor locomoción ya que no se observaron diferencias significativas en la distancia total recorrida entre los grupos evaluados (ver sección de resultados: fig. 23).

Para esta prueba, además, se generó un ayuno de 8 horas con la finalidad de homogenizar la motivación de los animales y así reducir la variabilidad en el despliegue conductual. Este periodo de ayuno no ocasiona elevaciones ni disminuciones de otras hormonas que pudieran causar estrés o una mayor sensibilidad olfatoria ya que los niveles de estas hormonas comienzan a modificarse debido a periodos de ayuno superiores a 16 horas (p.e. corticosterona, insulina) o a partir de las 48 horas (p.e. NPY, grelina) (Jensen et al., 2013; Palouzier-paulignan et al., 2012).

En el experimento 1, tras haber comenzado los tratamientos, el grupo de machos vehículo no mostraron una preferencia hacia el estímulo de hembras, ya que, el tiempo de olfacción hacia el estímulo de un macho sexualmente experto fue similar. Lo anterior puede ser debido a que el estímulo olfatorio haya perdido valor para los animales, ya que permanecieron durante todo el protocolo experimental sin interactuar sexualmente con una hembra, la cual, de acuerdo con la literatura, facilitaría la asociación y preferencia por los estímulos olfatorios de hembra (P. A. Brennan, 2004; P. Brennan & Keverne, 2015; Keller et al., 2009). Sin embargo, pese a que eran animales sexualmente intactos, mantuvieron un interés conservado hacia el estímulo de hembra comparándolo con el interés de olfateo hacia el aserrín limpio en los diferentes periodos de evaluación. Por otro lado, es posible que las pistas olfatorias volátiles contenidas

en el aserrín no sean suficientes para que los animales mantengan una clara preferencia por el estímulo de hembra, ya que, existen otras sustancias volátiles secretadas en otras partes del cuerpo de los animales (p.e. saliva, lágrimas) que promueven el despliegue conductual (P. A. Brennan, 2004; Muroi et al., 2006). El tratamiento con PRL mostró un comportamiento similar al grupo vehículo en la prueba POT, sin embargo, tras haber finalizado el tratamiento, el interés hacia los estímulos olfatorios (macho sexualmente experto y hembra receptiva) que mostraron los machos que recibieron PRL previamente, decae abruptamente en comparación con el grupo vehículo. Por otra parte, en el caso de los ratones que recibieron un tratamiento con sulpirida (experimento 1) se observó una clara preferencia hacia el estímulo olfatorio de hembra en todos los periodos de evaluación. Esta preferencia pudiera deberse a cambios transitorios en los niveles de DA en el núcleo accumbens debidos a la exposición del estímulo, ya que, Beny-Shefer y colaboradores (2017) demostraron que, ratones macho sin experiencia sexual que fueron expuestos a estímulos olfatorios de hembra, muestran una elevación de los niveles de DA en los primeros 12 minutos de exposición. Aunado a lo anterior, en ratones macho vírgenes incapaces de mostrar una preferencia olfatoria innata hacia las señales olfatorias femeninas, la activación optogenética de las proyecciones del VTA hacia el núcleo accumbens es suficiente para inducir una preferencia sexual en los ratones (Beny-Shefer et al., 2017). Alteraciones en la preferencia sexual de ratones macho hacia hembras podría sugerir así mismo deficiencias en el procesamiento de las propiedades gratificantes de las señales de hembras conespecíficas.

El hipotálamo medial, donde se concentran las neuronas TIDA, no tiene entradas sinápticas directas del circuito olfatorio (Moore et al., 1987; Price et al., 1991). Investigaciones recientes han indicado que hay relativamente poca entrada sináptica desde la corteza olfatoria al hipotálamo y que la proyección que está presente se limita en gran medida a una pequeña parte del hipotálamo lateral (Murata et al., 2019). En machos, hay escasos datos sobre la presencia del PRLR, en regiones asociadas a la olfacción tales como el BO, sin embargo, hay estudios que sugieren esta posibilidad dada la participación de la olfacción en conductas tales como la paternal y la sexual, siendo en esta última donde se observan las primeras afecciones debidas a una hiperprolactinemia (Bartke et

al., 1987; Cruz-Casallas et al., 1999; Maria, 2016; Nonomura et al., 1985; Rehman et al., 2000). Estas conductas dependen de la funcionalidad de estructuras como el BO accesorio, el cual envía proyecciones directas a la amígdala medial y esta a su vez al hipotálamo medial donde se ubican las neuronas TIDA (Moore et al., 1987; Newman, 1999; Price et al., 1991). La amígdala medial a su vez recibe información indirecta del BO principal a través de las capas profundas de la corteza piriforme (Price et al., 1991). Tanto el BO principal como el BO accesorio influyen en el despliegue de conductas sociales (Slotnick et al., 2010), sin embargo, puede que su participación no dependa de la fuente de olor sino en cómo cada estructura está procesando la señal olfatoria detectada. Se conoce que el BO principal puede activarse por componentes volátiles de la orina provocando una activación indirecta del BO accesorio a través de una vía noradrenérgica (Martel, 2009; Muroi et al., 2006).

En el experimento 2 se observa que tras haber finalizado el tratamiento con sulpirida los ratones pierden la preferencia hacia el estímulo de la hembra, lo cual coincide con lo observado en el tratamiento de PRL en el experimento 1, sugiriendo que el efecto de la hiperprolactinemia en machos está afectando regiones cerebrales implicadas con la olfacción así como con cuestiones innatas y reproductivas, por ejemplo la amígdala, estructura responsable de la contextualización del estímulo (Martel, 2009). Lo anterior es relevante ya que Salais-López y colaboradores (2018) mostraron la presencia del PRLR en la amígdala posterodorsal. También, podríamos asociar la carencia de preferencia sexual olfatoria a niveles bajos de testosterona, pues se conoce que niveles altos de PRL afectan los niveles de las hormonas sexuales afectando conductas asociadas con la reproducción (Nonomura et al., 1985). La testosterona podría actuar como un refinador de circuito favoreciendo la preferencia hacia el estímulo de hembra (Yoshikage et al., 2007). En el experimento 1, el tratamiento con sulpirida arrojó resultados diferentes a los observados en el experimento 2. Mientras que en el experimento 2 los ratones pierden preferencia hacia el estímulo de hembra receptiva tras una semana de haber finalizado el tratamiento, en el experimento 1, se observa una consistente preferencia hacia el estímulo de hembra receptiva en todos los periodos de evaluación. Lo anterior, podría ser debido a cambios transitorios de los niveles de DA sobre estructuras

cerebrales con especial participación en esta conducta como lo son el núcleo accumbens, la amígdala medial y la corteza piriforme anterior, estas últimas dos estructuras tienen un papel relevante en conductas de contexto social (Beny-Shefer et al., 2017; Perez et al., 2018). Además, nos sugiere que los cambios de la elevación de la PRL pudieran no ser directos sino debido a la alteración secundaria de otras hormonas y neurotransmisores. Alternativamente, si bien las regiones olfatorias primarias responsables de la entrada, procesamiento y filtraje de la información no se ven afectadas por los tratamientos, esta evidencia permitiría sugerir que son regiones olfatorias secundarias responsables de la integración de la información las que pudieran verse afectadas.

En el experimento 1, cualitativamente se observa que la capacidad de memoria (habitación) y la discriminación olfatoria para ambos tratamientos se ve afectada tras haber iniciado el tratamiento, siendo aún más evidente al haber finalizado el tratamiento. Sin embargo, este comportamiento no se observó en el experimento 2, en el cual los animales tratados con sulpirida no reflejan ninguna alteración en su capacidad para discriminar o habituar a olores, lo cual sugiere que el BO sigue manteniendo la dinámica de comunicación necesaria para procesar señales. Aunado a lo anterior, en las pruebas POT y PHD, se observa una consistente disminución en el tiempo de olfacción en todos los grupos evaluados tras haber comenzado el tratamiento. Este efecto no está relacionado con el tratamiento ya que se observa en todos los grupos y tampoco es debido a errores metodológicos ya que inicialmente los animales presentan el patrón de conducta esperado en esta prueba. Es posible que la disminución en los tiempos de investigación esté relacionada con una disminución en lo agradable que fueron inicialmente los estímulos tras los siguientes ensayos denominado como habituación afectiva (Ferdenzi et al., 2014).

En este trabajo se evaluó si un tratamiento con sulpirida, con el cual se espera incrementar los niveles circulantes de PRL, podría alterar la capacidad olfatoria de machos adultos, debido a que hay evidencias conductuales y fisiológicas tanto en macho como en hembras que sugieren su participación en comportamientos parentales como reproductivos (Corona et al., 2021; Larsen et al., 2008; Larsen & Grattan, 2010; Mak & Weiss, 2010; Shingo et al., 2003; Torner et al., 2013). Tras evaluar la capacidad de detección, identificación, memoria y

discriminación olfatoria en el experimento 2 se observó que, el tratamiento con el fármaco sulpirida promueve una pérdida de la preferencia sexual olfatoria. Esto es consistente con los efectos inhibitorios de un tratamiento para generar hiperprolactinemia sobre conductas asociadas a la reproducción. Esto podría explicarse de varias maneras: si la principal influencia de la PRL en machos incide sobre conductas socio-sexuales (Larsen et al., 2008; Mak & Weiss, 2010), es posible que alteraciones olfatorias debidas a una hiperprolactinemia se reflejen más claramente en conductas dependientes de contexto. Por otro lado, la ausencia de alteraciones olfatorias significativas también puede indicar que el tiempo de tratamiento no fue de suficiente duración para inducir cambios funcionales en la olfacción. A pesar de que no hay alteraciones significativas, aún no podemos descartar la participación de la PRL en la modulación olfatoria en machos porque se requieren pruebas bioquímicas e histológicas que nos permitan clarificar su participación.

Adicional a las pruebas olfatorias, en el experimento 2 se realizó una prueba motora, dado que se usó un antagonista de los receptores D2 el cual podría afectar la neurotransmisión dopaminérgica que juega un papel importante en la actividad motora en su conjunto. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros que se consideraron (distancia total recorrida, distancia total al margen, actividad horizontal y episodios de actividad estereotípica), que son suficientes y necesarios para descartar cualquier otra alteración motora (Tatem et al., 2014). La ausencia de alteraciones motoras sugiere que no hay efectos centrales del fármaco sulpirida, lo cual puede deberse a la baja permeabilidad del fármaco en la barrera hematoencefálica, principalmente, o la biodisponibilidad del fármaco dada la vía de administración (Benakis et al., 1976). La falta de alteraciones motoras coincide con la ausencia de diferencias en el peso y consumo de alimento de los animales durante el tratamiento, lo cual es favorable para el experimento ya que no hay influencia de otras hormonas (p. e. insulina, leptina) sobre la función olfatoria de los animales (ver revisión: (Palouzier-paulignan et al., 2012)). Sin embargo, tras una semana de haber finalizado el tratamiento se observaron cambios en el peso de los animales y su consumo de alimento, los cuales pudieran estar asociados con la hormona leptina, ya que, Ghamesi y colaboradores (2018) mostraron en ratas

inyectadas localmente en el hipotálamo ventro medial, a una concentración de 0.01 g/L de sulpirida, alteraciones sobre la secreción de leptina y los niveles plasmáticos de glucosa evidenciando una correlación negativa entre los niveles de estas hormonas.

Se ha reportado que el tratamiento con sulpirida da como resultado un aumento del peso corporal de ratas hembras pero no de machos (Baptista et al., 2004; Baptista, Araujo de Baptista, et al., 2002; Baptista, Lacruz, et al., 2002). Las evidencias sobre el peso y consumo alimenticio en esta tesis son consistentes con los reportes de Batista y colaboradores (Ahmadi & Ahmadi, 2016; Baptista, Araujo de Baptista, et al., 2002; Baptista, Lacruz, et al., 2002), quienes con una dosis de 40 mg/kg de sulpirida en ratones, por un periodo de tratamiento de 45 días, no observan cambios en el peso de los animales. Aunado a lo anterior, tampoco se observaron diferencias en el peso de ratones tratados durante 9 días con dosis de 40, 60, 80 mg/kg de sulpirida (Martín-López & Navarro, 1996). Es posible que los efectos observados en esta tesis sean debido en gran parte al metabolismo periférico del fármaco y no a una acción central (Benakis et al., 1976) lo cual es confirmado por las evidencias arrojadas por la prueba motora y discriminación olfatoria. Por otra parte, existe evidencia de que la sulpirida no cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, afectando entonces solo los receptores dopaminérgicos de la hipófisis, la cual está fuera de la barrera hematoencefálica.

Si bien, se conoce que la PRL favorece la discriminación de estímulos olfatorios y la proliferación de interneuronas como los son las células periglomerulares y granulares en el BO (Larsen et al., 2008; Larsen & Grattan, 2010; Mak & Weiss, 2010; Shingo et al., 2003), es importante recordar que los contextos bajo los cuales se ha medido lo anterior han sido relacionados primordialmente a conductas de tipo social (p. e., conducta maternal, elección de pareja, conducta paternal) que, además, implica la interacción entre los sujetos, lo cual hace que la información procesada no sea totalmente de una naturaleza volátil sino también de tipo no volátil. Donhoffner y colaboradores (2017) mostraron en ratas macho a dosis bajas de PRL y bromocriptina, un agonista para los receptores D2 que promueve niveles bajos de PRL, que los animales tratados con bromocriptina no presentaban el mismo despliegue conductual que aquellos

tratados con PRL en conductas tales como reconocimiento, aprendizaje y memoria social, evidenciando que estas conductas requieren de PRL para su despliegue.

Es posible que la participación de la hormona PRL en el procesamiento de información olfatoria no relacionada al contexto social no se equipare a la de conductas bajo este contexto. Este sería el aporte del presente trabajo, ya que se conoce muy poco de cómo influye la PRL en el procesamiento de información olfatoria etológicamente no relevante de tipo volátil, en un contexto patológico y en machos.

Conclusiones

La hiperprolactinemia en el ratón macho adulto modifica la capacidad olfatoria de olores sociales, pero no generales.

El tratamiento crónico (14 días) de sulpirida no presenta a largo plazo la preferencia sexual olfatoria de los machos, sin embargo, no altera la capacidad de detección, habituación ni de discriminación de olores generales, fuera del contexto social.

Adicionalmente, este tratamiento promueve una disminución en el peso corporal y un incremento en el consumo alimenticio de los ratones, pero no cambia la función motora gruesa en los ratones macho.

Bibliografía

- Ahmadi, A., & Ahmadi, E. (2016). The antipsychotic drug sulpiride induces insulin intolerance but does not affect body weight in adult male mice. *Comparative Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2138-4>
- Alizadeh, R., Hassanzadeh, G., Soleimani, M., Joghataei, M. taghi, Siavashi, V., Khorgami, Z., & Hadjighassem, M. (2015). Gender and age related changes in number of dopaminergic neurons in adult human olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.07.003>
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid Beta Inhibits Olfactory Bulb Activity and the Ability to Smell. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>
- Antunes, G., & Simoes de Souza, F. M. (2016). Olfactory receptor signaling. *Methods in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.003>
- Aoki, M., Wartenberg, P., Grünewald, R., Phillipps, H. R., Wyatt, A., Grattan, D. R., & Boehm, U. (2019). Widespread Cell-Specific Prolactin Receptor Expression in Multiple Murine Organs. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00234>
- Archunan, G. (2018). Odorant Binding Proteins: a key player in the sense of smell. *Bioinformation*. <https://doi.org/10.6026/97320630014036>
- Guillou, A., Romanò, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., Chen, C., Mollard, P., & Martin, A. O. (2015). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: Longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1571>
- Auriemma, R. S., De Alcubierre, D., Pirchio, R., Pivonello, R., & Colao, A. (2018). The effects of hyperprolactinemia and its control on metabolic diseases. In *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1434412>
- Banerjee, A., Marbach, F., Anselmi, F., Koh, M. S., Davis, M. B., Garcia da Silva, P., Delevich, K., Oyibo, H. K., Gupta, P., Li, B., & Albeanu, D. F. (2015). An Interglomerular Circuit Gates Glomerular Output and Implements Gain Control in the Mouse Olfactory Bulb. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.019>
- Baptista, T., Araujo de Baptista, E., Ying Kin, N. M. K. N., Beaulieu, S., Walker, D., Joober, R., Lalonde, J., & Richard, D. (2002). Comparative effects of the antipsychotics sulpiride or risperidone in rats. I: Bodyweight, food intake, body composition, hormones and glucose tolerance. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03616-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03616-8)
- Baptista, T., Lacruz, A., Pàez, X., Hernández, L., & Beaulieu, S. (2002). The antipsychotic drug sulpiride does not affect bodyweight in male rats. Is insulin resistance involved? *European Journal of Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01816-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01816-2)
- Baptista, T., De Baptista, E. A., Lalonde, J., Plamondon, J., Kin, N. M. K. N. Y.,

- Beaulieu, S., Joober, R., & Richard, D. (2004). Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.08.001>
- Barnett, S. C., & Chang, L. (2004). Olfactory ensheathing cells and CNS repair: Going solo or in need of a friend? In *Trends in Neurosciences* (Vol. 27, Issue 1, pp. 54–60). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.10.011>
- Bartke, A., Morgan, W. W., Clayton, R. N., Banerji, T. K., Brodie, A. M., Parkening, T. A., & Collins, T. J. (1987). Neuroendocrine studies in hyperprolactinaemic male mice. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1120215>
- Benakis, A., Pongis, M. A., Sugnaux, F., Glasson, B., Jirounek, H., Redard, M., & Vitus, J. (1976). Localization, distribution, elimination and metabolism of ¹⁴C-Sulpiride in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1007/BF03192279>
- Beny-Shefer, Y., Zilkha, N., Lavi-Avnon, Y., Bezalel, N., Rogachev, I., Brandis, A., Dayan, M., & Kimchi, T. (2017). Nucleus Accumbens Dopamine Signaling Regulates Sexual Preference for Females in Male Mice. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.062>
- Bernard, V., Young, J., & Binart, N. (2019). Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. In *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. In *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
- Boesveldt, S., Postma, E. M., Boak, D., Welge-Luessen, A., Schöpf, V., Mainland, J. D., Martens, J., Ngai, J., & Duffy, V. B. (2017). Anosmia-A clinical review. In *Chemical Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjx025>
- Brai, E., & Alberi, L. (2018). Olfaction, among the First Senses to Develop and Decline. In *Sensory Nervous System*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75061>
- Brennan, P. A. (2004). The nose knows who's who: Chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.01.010>
- Brennan, P., & Keverne, E. B. (2015). Biological complexity and adaptability of simple mammalian olfactory memory systems. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.020>
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M. R., & Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-09.2009>
- Briffaud, V., Fourcaud-Trocmé, N., Messaoudi, B., Buonviso, N., & Amat, C.

- (2012). The Relationship between Respiration-Related Membrane Potential Slow Oscillations and Discharge Patterns in Mitral/Tufted Cells: What Are the Rules? *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043964>
- Brown, R. S. E., Herbison, A. E., & Grattan, D. R. (2011). Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089185>
- Buonviso, N., Amat, C., Litaudon, P., Roux, S., Royet, J. P., Farget, V., & Sicard, G. (2003). Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02619.x>
- Cabrera-Reyes, E. A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N. A., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2017). Prolactin function and putative expression in the brain. In *Endocrine*. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>
- Cavarretta, F., Burton, S. D., Igarashi, K. M., Shepherd, G. M., Hines, M. L., & Migliore, M. (2018). Parallel odor processing by mitral and middle tufted cells in the olfactory bulb. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25740-x>
- Chaudhury, D., Manella, L., Arellanos, A., Escanilla, O., Cleland, T. A., & Linster, C. (2010a). Olfactory bulb habituation to odor stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 124(4), 490–499. <https://doi.org/10.1037/a0020293>
- Chen, C. R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., & Choi, D. (2014). Anatomy and Cellular Constituents of the Human Olfactory Mucosa: A Review. In *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361837>
- Chen, Y., Lin, Y. C., Kuo, T. W., & Knight, Z. A. (2015). Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033>
- Choi, D., Law, S., Raisman, G., & Li, D. (2008). Olfactory ensheathing cells in the nasal mucosa of the rat and human. *British Journal of Neurosurgery*, 22(2), 301–302. <https://doi.org/10.1080/02688690701883442>
- Cleland, T. A. (2014). Construction of odor representations by olfactory bulb microcircuits. In *Progress in Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63350-7.00007-3>
- Corona, R., Camacho, F. J., García-Horsman, P., Guerrero, A., Ogando, A., & Paredes, R. G. (2011). Different doses of estradiol benzoate induce conditioned place preference after paced mating. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.05.013>
- Corona, R., Jayakumar, P., Carbajo Mata, M. A., Del Valle-Díaz, M. F., Luna-García, L. A., & Morales, T. (2021). Sexually dimorphic effects of prolactin treatment on the onset of puberty and olfactory function in mice. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113652>
- Coronas-Samano, G., Ivanova, A. V., & Verhagen, J. V. (2016). The

Habituation/Cross-Habituation Test Revisited: Guidance from Sniffing and Video Tracking. *Neural Plasticity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9131284>

Courtiol, E., & Wilson, D. A. (2017). The olfactory mosaic: Bringing an olfactory network together for odor perception. *Perception*. <https://doi.org/10.1177/0301006616663216>

Croy, I., Nordin, S., & Hummel, T. (2014). Olfactory disorders and quality of life—an updated review. *Chemical Senses*, 39(3), 185–194. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt072>

Cruz-Casallas, P. E., Nasello, A. G., Hucke, E. E. T. S., & Felicio, L. F. (1999). Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: Relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00021-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00021-9)

D'Souza, R. D., & Vijayaraghavan, S. (2014). Paying attention to smell: Cholinergic signaling in the olfactory bulb. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00021>

Daulatzai, M. A. (2016). Dysfunctional Sensory Modalities, Locus Coeruleus, and Basal Forebrain: Early Determinants that Promote Neuropathogenesis of Cognitive and Memory Decline and Alzheimer's Disease. In *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9643-3>

DeMaria, S., & Ngai, J. (2010). The cell biology of smell. In *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008163>

Devore, S., Manella, L. C., & Linster, C. (2012). Blocking muscarinic receptors in the olfactory bulb impairs performance on an olfactory short term memory task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00059>

Dibattista, M., Pifferi, S., Boccaccio, A., Menini, A., & Reisert, J. (2017). The long tale of the calcium activated Cl⁻ channels in olfactory transduction. In *Channels*. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1307489>

Donhoffner, M. E., Al Saleh, S., Schink, O., & Wood, R. I. (2017). Prosocial effects of prolactin in male rats: Social recognition, social approach and social learning. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.09.011>

Drago, F., & Lissandrello, C. O. (2000). The “low-dose” concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *European Journal of Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00678-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00678-6)

Eckmeier, D., & Shea, S. D. (2014). Noradrenergic Plasticity of Olfactory Sensory Neuron Inputs to the Main Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(46), 15234–15243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0551-14.2014>

Egli, M., Leeners, B., & Kruger, T. H. C. (2010). Prolactin secretion patterns: Basic mechanisms and clinical implications for reproduction. In *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0033>

- Ferdenzi, C., Poncelet, J., Rouby, C., & Bensafi, M. (2014). Repeated exposure to odors induces affective habituation of perception and sniffing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00119>
- Fernández, M., Mollinedo-Gajate, I., & Peñagarikano, O. (2018a). Neural Circuits for Social Cognition: Implications for Autism. In *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.013>
- Fleming, S. M. (2014). Olfactory assays for mouse models of neurodegenerative disease. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. <https://doi.org/10.3791/51804>
- Ford, N. C., & Griff, E. R. (2017). Steady-state centrifugal input via the lateral olfactory tract modulates spontaneous activity in the rat main olfactory bulb. *Neuroscience*, *348*, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.013>
- Frasnelli, J., & Hummel, T. (2005). Olfactory dysfunction and daily life. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. <https://doi.org/10.1007/s00405-004-0796-y>
- Freemark, M. (1996). Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: potential roles for lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.137.3.934>
- Fukunaga, I., Herb, J. T., Kollo, M., Boyden, E. S., & Schaefer, A. T. (2014). Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3760>
- Garcia-Tornadu, I. A., Luque, G. M., Perez-Millán, M. I., Ramirez, M. C., Recouvreux, V., Ornstein, A. M., Diaz-Torga, G., & Becu-Villalobos, D. (2013). Dopaminergic regulation of food intake: Insights obtained from the dopamine receptor D2 knockout mouse. In *Food Intake: Regulation, Assessing and Controlling*.
- Garrison, J. L., & Knight, Z. A. (2017). Linking smell to metabolism and aging. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aao5474>
- Ghasemi, M., Mehranfard, N., & Alaei, H. (2018). Modulatory effect of ventromedial hypothalamic D2 receptors on leptin and glucose concentration. *Physiology and Pharmacology (Iran)*.
- Goulding, E. H., Schenk, A. K., Juneja, P., MacKay, A. W., Wade, J. M., & Tecott, L. H. (2008). A robust automated system elucidates mouse home cage behavioral structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809053106>
- Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/joe-15-0213>
- Gregerson, K. A. (2006). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50037-3>

- Grosmaître, X., Santarelli, L. C., Tan, J., Luo, M., & Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature Neuroscience*, *10*(3), 348–354. <https://doi.org/10.1038/nn1856>
- Hashemian, F., Shafiqh, F., & Roohi, E. (2016). Regulatory role of prolactin in paternal behavior in male parents: A narrative review. In *Journal of Postgraduate Medicine*. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.186389>
- Höglinger, G. U., Alvarez-Fischer, D., Arias-Carrión, O., Djufri, M., Windolph, A., Keber, U., Borta, A., Ries, V., Schwarting, R. K. W., Scheller, D., & Oertel, W. H. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1451-y>
- Huart, C., Rombaux, P., & Hummel, T. (2013). Plasticity of the human olfactory system: The olfactory bulb. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules180911586>
- Hummel, T., Whitcroft, K. L., Andrews, P., Altundag, A., Cinghi, C., Costanzo, R. M., Damm, M., Frasnelli, J., Gudziol, H., Gupta, N., Haehner, A., Holbrook, E., Hong, S. C., Hornung, D., Hüttenbrink, K. B., Kamel, R., Kobayashi, M., Konstantinidis, I., Landis, B. N., ... Welge-Luessen, A. (2017). Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhino16.248>
- Hutch, C. R., Hillard, C. J., Jia, C., & Hegg, C. C. (2015). An endocannabinoid system is present in the mouse olfactory epithelium but does not modulate olfaction. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.056>
- Ieraci, A., Mallei, A., & Popoli, M. (2016). Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity*. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>
- Imamura, F., & Hasegawa-Ishii, S. (2016). Environmental toxicants-induced immune responses in the olfactory mucosa. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00475>
- Jagetia, S., Milton, A. J., Stetzk, L. A., Liu, S., Pai, K., Arakawa, K., Mandairon, N., & Wesson, D. W. (2018). Inter-and Intra-Mouse Variability in Odor Preferences Revealed in an Olfactory Multiple-Choice Test. *Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/bne0000233>
- Jensen, T. L., Kiersgaard, M. K., Sørensen, D. B., & Mikkelsen, L. F. (2013). Fasting of mice: A review. In *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1177/0023677213501659>
- Kang, C. W., Han, Y. E., Lee, M. K., Cho, Y. H., Kang, N. N., Koo, J. H., Ku, C. R., & Lee, E. J. (2018). Olfactory marker protein regulates prolactin secretion and production by modulating Ca²⁺ and TRH signaling in lactotrophs. *Experimental and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0035-z>
- Kang, N. N., & Koo, J. H. (2012). Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. In *BMB Reports*. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.11.232>
- Kass, M. D., Czarnecki, L. A., Moberly, A. H., & McGann, J. P. (2017). Differences

in peripheral sensory input to the olfactory bulb between male and female mice. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep45851>

- Kawai, T., Abe, H., & Oka, Y. (2012). Dopaminergic neuromodulation of synaptic transmission between mitral and granule cells in the teleost olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, *107*(5), 1313–1324. <https://doi.org/10.1152/jn.00536.2011>
- Kay, L. M. (2014). Circuit oscillations in odor perception and memory. *Progress in Brain Research*, *208*, 223–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63350-7.00009-7>
- Kay, L. M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Líbano, D., & Kopell, N. (2009). Olfactory oscillations: the what, how and what for. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 32, Issue 4, pp. 207–214). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.008>
- Keller, M., Baum, M. J., Brock, O., Brennan, P. A., & Bakker, J. (2009). The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.020>
- Kikuta, S., Fletcher, M. L., Homma, R., Yamasoba, T., & Nagayama, S. (2013). Odorant Response Properties of Individual Neurons in an Olfactory Glomerular Module. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.022>
- Kokay, I. C., Wyatt, A., Phillipps, H. R., Aoki, M., Ectors, F., Boehm, U., & Grattan, D. R. (2018). Analysis of prolactin receptor expression in the murine brain using a novel prolactin receptor reporter mouse. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/jne.12634>
- Kosaka, K., & Kosaka, T. (2005). Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: Compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. In *Anatomical Science International*. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073x.2005.00092.x>
- Kosaka, T., Pignatelli, A., & Kosaka, K. (2019). Heterogeneity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in the main olfactory bulb of the mouse. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.10.004>
- La Torre, D., & Falorni, A. (2007). Pharmacological causes of hyperprolactinemia. In *Therapeutics and Clinical Risk Management*. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1067944>
- Larsen, C. M., Kokay, I. C., & Grattan, D. R. (2008). Male pheromones initiate prolactin-induced neurogenesis and advance maternal behavior in female mice. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.020>
- Larsen, C. M., & Grattan, D. R. (2010). Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1385>
- Le Pichon, C. E., Valley, M. T., Polymenidou, M., Chesler, A. T., Sagdullaev, B. T., Aguzzi, A., & Firestein, S. (2009). Olfactory behavior and physiology are

- disrupted in prion protein knockout mice. *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nn.2238>
- Lefèvre, L., Courtiol, E., Garcia, S., Thévenet, M., Messaoudi, B., & Buonviso, N. (2016). Significance of sniffing pattern during the acquisition of an olfactory discrimination task. *Behavioural Brain Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.039>
- Levine, S., & Muneyirci-Delale, O. (2018). Stress-induced hyperprolactinemia: Pathophysiology and clinical approach. *Obstetrics and Gynecology International*. <https://doi.org/10.1155/2018/9253083>
- Lin, D. Y., Zhang, S. Z., Block, E., & Katz, L. C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature03414>
- Linster, C. (2018). Cellular and network processes of noradrenergic modulation in the olfactory system. *Brain Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.008>
- Liu, G., Froudarakis, E., Patel, J. M., Kochukov, M. Y., Pekarek, B., Hunt, P. J., Patel, M., Ung, K., Fu, C. H., Jo, J., Lee, H. K., Tolia, A. S., & Arenkiel, B. R. (2019). Target specific functions of EPL interneurons in olfactory circuits. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11354-y>
- Lo, J. C., Beck, G. J., Kaysen, G. A., Chan, C. T., Kliger, A. S., Rocco, M. V., & Chertow, G. M. (2017). Hyperprolactinemia in end-stage renal disease and effects of frequent hemodialysis. *Hemodialysis International*.
<https://doi.org/10.1111/hdi.12489>
- Lopez-Vicchi, F., Ladyman, S. R., Ornstein, A. M., Gustafson, P., Knowles, P., Luque, G. M., Grattan, D. R., & Becu-Villalobos, D. (2020). Chronic high prolactin levels impact on gene expression at discrete hypothalamic nuclei involved in food intake. *FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902357R>
- Luque, G. M., Lopez-Vicchi, F., María Ornstein, A., Brie, B., De Winne, C., Fiore, E., Perez-Millan, M. I., Mazzolini, G., Rubinstein, M., & Becu-Villalobos, D. (2016). Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine d2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00200.2016>
- Lüthy, I. A., Segura, E. T., Lüthy, V. I., Charreau, E. H., & Calandra, R. S. (1985). Prolactin binding sites in the brain and kidneys of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Journal of Comparative Physiology B*.
<https://doi.org/10.1007/BF00694452>
- Lyons, D. J., Hellysaz, A., & Broberger, C. (2012). Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: Novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>
- Macedo-Márquez, A., Vázquez-Acevedo, M., Ongay-Larios, L., Miranda-Astudillo, H., Hernández-Muñoz, R., González-Halphen, D., Grolli, S., &

- Ramoni, R. (2014). Overexpression of a monomeric form of the bovine odorant-binding protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress. *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.910867>
- Machado, C., Reis-Silva, T., Lyra, C., Felicio, L., & Malnic, B. (2018). Buried Food-seeking Test for the Assessment of Olfactory Detection in Mice. *BIO-PROTOCOL*. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2897>
- Macotela, Y., Triebel, J., & Clapp, C. (2020). Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.01.004>
- Mähler, M., Berar, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., & Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
- Mak, G. K., & Weiss, S. (2010). Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2550>
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80581-4)
- Maria, M. (2016). The Role of Prolactin in Men. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*. <https://doi.org/10.4172/2161-1017.1000222>
- Martel, K. L. (2009). Functional interaction of the main and accessory olfactory systems in mice. In *Dissertation Abstracts International: Section B: The Sciences and Engineering*.
- Martel, K. L., & Baum, M. J. (2009). A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amygdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06564.x>
- Martín-López, M., & Navarro, J. F. (1996). Effect of sulpiride on body weight after chronic administration in male mice. *Psicothema*.
- Medendorp, W. E., Petersen, E. D., Pal, A., Wagner, L. M., Myers, A. R., Hochgeschwender, U., & Jenrow, K. A. (2018). Altered behavior in mice socially isolated during adolescence corresponds with immature dendritic spine morphology and impaired plasticity in the prefrontal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00087>
- Miwa, T., Furukawa, M., Tsukatani, T., Costanzo, R. M., DiNardo, L. J., & Reiter, E. R. (2001). Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery*, 127(5), 497–503. <https://doi.org/10.1001/archotol.127.5.497>
- Moore, K. E., Demarest, K. T., & Lookingland, K. J. (1987). Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(87\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90055-4)

- Mori, K. (2016). Axonal Projection of Olfactory Bulb Tufted and Mitral Cells to Olfactory Cortex. In *Axons and Brain Architecture*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801393-9.00001-3>
- Muroi, Y., Ishii, T., Komori, S., Kitamura, N., & Nishimura, M. (2006). Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.026>
- Mostafapour, S., Zare, S., Sadrkhanlou, R. A., Ahmadi, A., & Razi, M. (2014). Sulpiride-induced hyperprolactinemia in mature female rats: Evidence for alterations in the reproductive system, pituitary and ovarian hormones. *International Journal of Fertility and Sterility*.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
- Nitenson, A. S., Stackpole, E. E., Truszkowski, T. L. S., Midroit, M., Fallon, J. R., & Bath, K. G. (2015). Fragile X mental retardation protein regulates olfactory sensitivity but not odorant discrimination. *Chemical Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv019>
- Nonomura, M., Hoshino, K., Harigaya, T., Hashimoto, H., & Yoshida, O. (1985). Effects of hyperprolactinaemia on reproduction in male mice. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1070071>
- Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., Quintana, A., Zweifel, L. S., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., & Palmiter, R. D. (2016). Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4274>
- Palouzier-paulignan, B., Lacroix, M. C., Aimé, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., Julliard, A. K., Tucker, K., & Fadool, D. A. (2012). Olfaction under metabolic influences. *Chemical Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs059>
- Pankevich, D. E., Baum, M. J., & Cherry, J. A. (2004). Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2376-04.2004>
- Perez-Villalba, A., Palop, M., Pérez-Sánchez, F., & Fariñas, I. (2015). Assessment of Olfactory Behavior in Mice: Odorant Detection and Habituation-Dishabituation Tests. *BIO-PROTOCOL*. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1518>
- Perez, E. C., Rodgers, S. P., Inoue, T., Pedersen, S. E., Leasure, J. L., & Gaber, M. W. (2018). Olfactory memory impairment differs by sex in a rodent model of pediatric radiotherapy. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00158>

- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2017). Dopaminergic neurones in the main olfactory bulb: An overview from an electrophysiological perspective. In *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00007>
- Portillo, W., & Paredes, R. G. (2004). Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.001>
- Price, J. L., Slotnick, B. M., & Revial, M. -F. (1991). Olfactory projections to the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.903060309>
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F., & Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rehman, J., Christ, G., Alyskewycz, M., Kerr, E., & Melman, A. (2000). Experimental hyperprolactinemia in a rat model: Alteration in centrally mediated neuroerectile mechanisms. *International Journal of Impotence Research*. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900473>
- Romanò, N., Yip, S. H., Hodson, D. J., Guillou, A., Parnaudeau, S., Kirk, S., Tronche, F., Bonnefont, X., Le Tissier, P., Bunn, S. J., Grattan, D. R., Mollard, P., & Martin, A. O. (2013). Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4415-12.2013>
- S.H., Y., N., R., P., G., D.J., H., E.J., W., I.C., K., A.O., M., P., M., D.R., G., & S.J., B. (2019). Elevated Prolactin during Pregnancy Drives a Phenotypic Switch in Mouse Hypothalamic Dopaminergic Neurons. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.067> LK
- Salais-López, H., Agustín-Pavón, C., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2018). The maternal hormone in the male brain: Sexually dimorphic distribution of prolactin signalling in the mouse brain. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208960>
- Saleem, M., Martin, H., & Coates, P. (2018). Prolactin biology and laboratory measurement: An update on physiology and current analytical issues. In *Clinical Biochemist Reviews*.
- Sanberg, P. R., Hagenmeyer, S. H., & Henault, M. A. (1985). Automated measurement of multivariate locomotor behavior in rodents. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*.
- Sanderson, D. J., & Bannerman, D. M. (2011). Competitive Short-Term and Long-Term Memory Processes in Spatial Habituation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. <https://doi.org/10.1037/a0021461>

- Schmid, S., Wilson, D. A., & Rankin, C. H. (2015). Habituation mechanisms and their importance for cognitive function. In *Frontiers in Integrative Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00097>
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J. C., & Weiss, S. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1076647>
- Sinding, C., Valadier, F., Al-Hassani, V., Feron, G., Tromelin, A., Kontaris, I., & Hummel, T. (2017). New determinants of olfactory habituation. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep41047>
- Slotnick, B., Restrepo, D., Schellinck, H., Archbold, G., Price, S., & Lin, W. (2010). Accessory olfactory bulb function is modulated by input from the main olfactory epithelium. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07141.x>
- Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., & Marsicano, G. (2014). New insights on food intake control by olfactory processes: The emerging role of the endocannabinoid system. In *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.023>
- Sorokowski, P., Karwowski, M., Misiak, M., Marczak, M. K., Dziekan, M., Hummel, T., & Sorokowska, A. (2019). Sex differences in human olfaction: A meta-analysis. In *Frontiers in Psychology*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00242>
- Stephan, A. B., Tobochnik, S., Dibattista, M., Wall, C. M., Reisert, J., & Zhao, H. (2012). The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCKX4 governs termination and adaptation of the mammalian olfactory response. *Nature Neuroscience*, *15*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1038/nn.2943>
- Su, C. Y., Menuz, K., & Carlson, J. R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. In *Cell* (Vol. 139, Issue 1, pp. 45–59). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015>
- Swaney, W. T., Curley, J. P., Champagne, F. A., & Keverne, E. B. (2007). Genomic imprinting mediates sexual experience-dependent olfactory learning in male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609471104>
- Takahashi, H., Ogawa, Y., Yoshihara, S. I., Asahina, R., Kinoshita, M., Kitano, T., Kitsuki, M., Tatsumi, K., Okuda, M., Tatsumi, K., Wanaka, A., Hirai, H., Stern, P. L., & Tsuboi, A. (2016). A subtype of olfactory bulb interneurons is required for odor detection and discrimination behaviors. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2783-15.2016>
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/51785>
- Thonhauser, K. E., Raffetzedder, A., & Penn, D. J. (2019). Sexual experience has no effect on male mating or reproductive success in house mice. *Scientific*

Reports. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48392-x>

- Torner, L., Tinajero, E., Lajud, N., Quintanar-Stéphano, A., & Olvera-Cortés, E. (2013). Hyperprolactinemia impairs object recognition without altering spatial learning in male rats. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.031>
- Trinh, K., & Storm, D. R. (2004). Detection of odorants through the main olfactory epithelium and vomeronasal organ of mice. *Nutrition Reviews*. <https://doi.org/10.1301/nr.2004.nov.S189-S192>
- Walliczek-Dworschak, U., & Hummel, T. (2017). The Human Sense of Olfaction. In *Facial Plastic Surgery*. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1603828>
- Yamaguchi, M. (2017). The role of sleep in the plasticity of the olfactory system. In *Neuroscience Research* (Vol. 118, pp. 21–29). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.03.014>
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current Protocols in Neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>
- Yoshikage, M., Toshiaki, I., Seiichi, K., Nobuo, K., & Nishimura, M. (2007). Sex steroids modulate the signals from volatile female odors in the accessory olfactory bulb of male mice. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.025>
- Zhan, X., Yin, P., & Heinbockel, T. (2013). The basal forebrain modulates spontaneous activity of principal cells in the main olfactory bulb of anesthetized mice. *Frontiers in Neural Circuits*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00148>
- Zhang, W., Sun, C., Shao, Y., Zhou, Z., Hou, Y., & Li, A. (2019). Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36538-2>
- Zhou, Y., Fang, F. H., Pan, P., Liu, Z. R., & Ji, Y. H. (2017). Visual deprivation induce cross-modal enhancement of olfactory perception. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.140>
- Zolotykh, M. A., & Kozhevnikova, E. N. (2017). The effect of social experience on olfactory preference in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.013>

LA BAILARINA

CIERTA VEZ, UNA BAILARINA CON SUS MÚSICOS ARRIBÓ
A LA CORTE DEL PRÍNCIPE DE BIRKASHA. Y, ADMITIDA EN
LA CORTE, BAILO ANTE EL PRÍNCIPE AL SON DEL LAÚD Y LA
FLAUTA Y LA CÍTARA.

BAILO LA DANZA DE LAS LLAMAS, Y LA DANZA DE LAS
ESPADAS Y LAS LANZAS; BAILÓ LA DANZA DE LAS ESTRELLAS
Y LA DANZA DEL ESPACIO. Y, POR ÚLTIMO, LA DANZA DE
LAS FLORES AL VIENTO.

LUEGO, SE DETUVO ANTE EL TRONO DEL PRÍNCIPE Y
DOBLÓ SU CUERPO ANTE ÉL. Y EL PRÍNCIPE LE SOLICITÓ QUE
SE ACERCARÁ, Y DIJO: “HERMOSA MUJER, HIJA DE LA GRACIA Y DEL
ENCANTO, ¿DESDE CUÁNDO EXISTE TU ARTE? ¿Y
CÓMO ES QUE DOMINAS TODOS LOS ELEMENTOS CON TU
RITMO Y TUS RIMAS?”

Y LA BAILARINA, INCLINÁNDOSE NUEVAMENTE ANTE EL PRÍNCIPE, DIJO:
“PODEROSA Y AGRACIADA MAJESTAD, DESCONOZCO LA RESPUESTA A TUS PREGUNTAS.
SÓLO ESTO SÉ: EL ALMA DEL FILÓSOFO HABITA EN SU CABEZA; EL ALMA DEL
POETA EN SU CORAZÓN; EL ALMA DEL CANTOR PERSISTE EN SU GARGANTA;
MÁS EL ALMA DE LA BAILARINA LATE EN TODO SU CUERPO”

GIBRAN JALIL GIBRAN, *EL VAGABUNDO*