

Carrera de Licenciatura en Ciencias, mención biología.

Análisis de la potencia olfatoria de la fracción soluble en agua del petróleo
crudo mediante registros de electroolfatograma en trucha arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*).

Tesis.

Daniela Macarena Ponce López.

Licenciatura en Ciencias, mención Biología, Universidad de Valparaíso, Chile.

Tutor: Oliver Schmachtenberg.

Co-tutor: Jesús Olivares D.

Centro Interdisciplinario de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de
Valparaíso, Chile.

2017.

DANIELA MACARENA PONCE LÓPEZ.

Trabajo de titulación presentado en conformidad a los requisitos para
obtener el grado académico de Licenciado en Ciencias.

COMISIÓN DE TÍTULO.

Oliver Schmachtenberg.

Director.

Facultad de Ciencias.

Doris Oliva Ekelund.

Miembro de la comisión.

Facultad de Ciencias.

Maritza Sepúlveda Martínez.

Miembro de la comisión.

Facultad de Ciencias.

CONTENIDO.

	Pág.
Agradecimientos.....	6
Índice de figuras.....	7
Resumen.....	9
Introducción.....	10
• Características del olfato en ambientes acuáticos.	
• Anatomía del órgano olfatorio.	
• Transducción del órgano olfatorio.	
• Transducción olfatoria.	
• Adaptación olfatoria.	
• Características de la respuesta fisiológica.	
• Implicancias de los derrames de petróleo sobre animales marinos.	
• Planteamiento del problema.	
Hipótesis del estudio.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Materiales y métodos.....	17
• Animales.	

- Montaje de la trucha en la cámara de registro de EOG.
- Protocolo de estimulación.
- Preparación de dilución de petróleo crudo.
- Preparación de los estímulos de L-Serina a 100 μ M.
- Criosecciones del órgano olfatorio.
- Análisis de datos.

Resultados.....21

- Comparación de controles.
- Respuesta a las distintas diluciones de FSA-PC.
- Respuesta de L-Serina a 100 μ M realizados después de haber estimulado con las distintas diluciones de FSA-PC.
- Respuestas de L-Serina a 100 μ M frente a perfusiones prolongadas de FSA-PC.
- Estímulos de L-Serina 100 a μ M en las distintas diluciones de FSA-PC orden de estimular de menor a mayor concentración.
- Estímulos de L-Serina a 100 μ M en las distintas diluciones de FSA-PC orden de estimular de mayor a menor concentración.
- Criosecciones del órgano olfatorio.

Discusión.....36

- Respuesta electrofisiológica a las distintas diluciones de FSA-PC.
- Respuesta de L-Serina a 100 μ M.

Conclusiones.....	41
Referencias.....	42
Anexo.....	48

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a mi tutor de tesis Dr. Oliver Schmachtenberg por darme la oportunidad de aprender todos estos años y también de darme la oportunidad de realizar mi tesis en esto, que es lo que más me gusta y a Jesús Olivares por enseñarme todas las técnicas para poder desenvolverme en esta área.

A todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y además por todos los buenos momentos, por toda la ayuda y apoyo moral en este año de trabajo. En especial quisiera agradecer a Adolfo Agurto que realizó todas las gestiones para obtener el petróleo crudo, lo que me facilito enormemente realizar esta tesis.

A David Neira por esas largas conversaciones ñoñas en esos días de febrero, por el apoyo, los consejos y por tu buena voluntad para ayudarme en todo lo que necesité en este proceso, de verdad muchas gracias.

A Alex Vielma por ser un apoyo fundamental en todo esto, porque en este año nos hicimos muy amigos, también por ser quien siempre estuvo ahí dispuesto a ayudarme con todas mis dudas, por quedarte hasta 10 u 11 de la noche conmigo en el laboratorio, por obligarme a terminar las cosas cuando ya no tenía ganas con la intención de que todo saliera de la mejor forma posible y por todos tus consejos.

A mis padres, mi hermano y a mi pequeña sobrina por ser el apoyo fundamental y mi pilar durante en todo este proceso, gracias por darme ánimo en todo momento y por darme la excelente educación que recibí de ustedes, gracias a ustedes estoy aquí a punto de convertirme en profesional. Gracias también por creer en mí y en mis capacidades. Los amo.

Y por último quisiera agradecer a Giovanni Celle, mi momo, quien a pesar de los altos y bajos siempre he recibido tus palabras de aliento, tu amor y cariño incondicional. Gracias a ti y a tu familia por haber estado en todos los momentos difíciles que viví durante toda esta etapa y lo más importante gracias por hacerme parte de tu hogar. Por todo esto no me queda más de decirte que te quiero y extraño mucho.

INDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1: Comparación de la amplitud del EOG en respuesta a estímulos controles en <i>Oncorhynchus mykiss</i>	21
Figura 2: Registros representativos de EOG frente a estímulos controles en trucha arcoíris.....	22
Figura 3: Respuestas de los registros de EOG a las distintas diluciones seriadas de FSA-PC.....	23
Figura 4: Registros de EOG representativos a las distintas diluciones de FSA-PC de menor a mayor concentración.....	24
Figura 5: Curva dosis-respuesta de las diluciones de la fracción soluble en agua del petróleo crudo (FSA-PC).....	25
Figura 6: Respuestas de EOG a L-Serina después de estimular con las diluciones de FSA-PC.....	26
Figura 7: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina después de haber estimulado con las diluciones de FSA-PC en trucha arcoíris.....	27
Figura 8: Respuesta de EOG a estímulos de L-Serina a 100 μ M después de las perfusiones realizadas en la trucha arcoíris.....	29
Figura 9: Imágenes representativas de los registros de EOG L-Serina a 100 μ M después de haber realizado las perfusiones en la trucha arcoíris.....	30

Figura 10: Respuesta de EOG a L-Serina a 100 μ M en las distintas diluciones de FSA-PC (estimulación creciente).....	31
Figura 11: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina a 100 μ M en las distintas diluciones de FSA-PC (Estimulación creciente) en trucha arcoiris.....	32
Figura 12: Respuesta de EOG a estímulos de L-Serina a 100 μ M en diluciones seriadas de FSA-PC (estimulación decreciente).....	33
Figura 13: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina a 100 μ M en las distintas diluciones de FSA-PC (Estimulación decreciente) en trucha arcoíris.....	34
Figura 14: Crio secciones del órgano olfatorio de <i>Oncorhynchus mykiss</i> a 35 μ m de grosor realizadas en el criostato.....	35

RESUMEN.

Los derrames de petróleo en ambientes acuáticos son muy dañinos para el ecosistema, ya que provocan la muerte de muchos organismos, generando contaminación. Los peces en general, pueden evitar la fracción de petróleo hidrófoba nadando a lugares sin contaminación, pero sólo si reciben la información sensorial adecuada. Este estudio pretende evaluar cómo la fracción soluble en agua del petróleo crudo (FSA-PC) puede ser detectada por la trucha arcoíris mediante el olfato, observar si la exposición inmediata, a corto y largo plazo (45 minutos y 24 horas) a la FSA-PC afecta la respuesta a odorantes ya estandarizados (L-Serina) y a través de cortes histológicos, observar si existe daño en el órgano olfatorio. Para esto se utilizó la técnica de electroolfatograma (EOG), para registrar la actividad eléctrica de un grupo de neuronas receptoras olfativas desde la mucosa olfatoria, y se estimuló con distintas diluciones de la FSA-PC, (1:10; 1:100; 1:10³; 1:10⁴ y 1:10⁵), intercalando entre cada dilución de FSA-PC estímulos de L-Serina a 100 µM. Hubo respuesta a todas las diluciones de FSA-PC lo que sugiere que la fracción soluble en agua del petróleo crudo es un olor para la trucha arcoíris. La respuesta de L-Serina a 100 µM aumenta al estimular con las diluciones de FSA-PC más concentradas, indicando la existencia de algún mecanismo de potenciación y/o recuperación. Al estimular con L-Serina a 100 µM después de las perfusiones no se observaron cambios significativos. En los cortes histológicos, se observó un leve engrosamiento del epitelio en la exposición de 24 horas. Se necesitan realizar estudios de tipo conductual para correlacionar los hallazgos observados en este estudio con la reacción de las truchas frente a la presencia de petróleo.

INTRODUCCION.

Los peces en general, son considerados un buen modelo animal de experimentación para estudios relacionados con el olfato, ya que su sistema olfatorio responde a una gama mucho más amplia de estímulos que el gusto. El olfato de los peces permite reconocer zonas geográficas y detectar feromonas (Bone & Moore, 2008). Según la clasificación existente, el salmón pertenece a la subfamilia Salmonidae, junto con la subfamilia Coregoninae y Thymallinae, que son incluidos en la familia Salmonidae (suborden Salmonoidei, orden Salmoniformes) (Nelson *et al*, 2016). Esta familia comprende siete géneros, tales como: *Salmo*, *Salvenilus*, *Brachymystax*, *Hucho*, *Salmothymus*, *Salvethymus* y *Oncorhynchus* (Altukhov *et al*, 2008). *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) o trucha arcoíris es un pez eurihalino, es decir, que vive en aguas con un amplio rango de salinidad, sin que se vean afectados fisiológicamente. Su ciclo de vida lo desarrollan en agua dulce y agua de mar, comenzando en ríos para luego de estar lo suficientemente maduros para trasladarse al mar. Luego de estar unos tres años en el mar alcanzan su madurez sexual, regresando al río en donde nacieron. Los salmónidos poseen un instinto migratorio propio, por lo cual cada generación retorna a desovar en el mismo lugar que lo hicieron sus progenitores. El área del desove se produce generalmente en zonas de corrientes rápidos y de fondos rocosos (Abud *et al*, 2009). Los salmónidos se distribuye de forma nativa en el Océano Pacífico, en Asia y América del Norte, aunque de forma introducida se encuentran en casi todo el mundo, tanto así que es considerada una especie invasora que puede llegar a causar graves daños ecológicos en las zonas en donde se ha introducido (Baxter *et al*, 2007).

Los factores que justifican el uso de las truchas como animal de experimentación para realizar estudios electrofisiológicos es su sistema olfatorio separado del respiratorio, lo que es de gran ayuda, puesto que la señal olfatoria no se ve alterada por el ritmo respiratorio. La mayoría de los peces tienen la capacidad de percibir olores a muy bajas concentraciones, lo que es aprovechado para propósitos migratorios, ya que éstos son capaces de distinguir el río en el cual nacieron (Nakatani & Nevessi, 1991). Otro beneficio no menos importante que tiene trabajar con teleósteos es que su epitelio olfatorio es de fácil acceso.

Características del olfato en ambientes acuáticos.

El olfato en peces tiene un rol importante, ya que les permite buscar alimento, aparearse, detectar depredadores y/o búsqueda de sitios de desove, como ocurre en el caso de las truchas arcoíris (Ache & Young, 2005; Bone & Moore, 2008), incluso en donde los otros sentidos fracasan, como aguas turbias, con poca luminosidad o de flujo rápido (Sorensen and Caprio, 1998). Los peces teleósteos tienen un sistema olfatorio que les permite detectar y discriminar diferentes estímulos olfatorios, en su mayoría hidrófilos, como aminoácidos, nucleótidos, sales biliares, esteroides gonadales y prostaglandinas. Estos distintos odorantes están relacionados con distintos comportamientos como alimentación, orientación y reproducción en peces (Sorensen and Caprio, 1998).

Anatomía del órgano olfatorio.

Las cavidades nasales de la trucha arcoíris se ubican en la cara dorsal-anterior de la cabeza, donde cada cavidad presenta dos aperturas que permite el ingreso y salida de agua. A diferencia de la mayoría de los vertebrados, los teleósteos carecen de un órgano vomeronasal, en su lugar tienen un solo epitelio olfativo pseudoestratificado, ubicado en el piso de la cavidad nasal. Este epitelio está dispuesto en forma de lamelas las que dan origen a una roseta olfatoria multilamelar, que crece proporcionalmente junto con el desarrollo del animal. Cada lamela está compuesta por dos capas epiteliales: una *sensorial* y una *no-sensorial*. En el epitelio olfatorio *sensorial* existen por lo menos tres tipos principales de células: *células sustentaculares*, *basales* y *olfatorias* (DeMaria & Ngai, 2010; Kleene, 2008; Bazáes *et al*, 2013). Estas últimas se clasifican en 3 tipos: *células ciliadas*, *células con microvellosidades* y *células criptadas*. Las neuronas olfatorias ciliadas se localizan en el centro del epitelio olfatorio y sus largas dendritas se extienden hasta su superficie, expresando proteínas receptoras olfatorias, en donde ocurre la transducción del olfato. (Hansen & Zielinski, 2005).

Transducción olfatoria.

La transducción olfatoria comienza cuando la molécula del odorante se une a la proteína receptora que se encuentra en los cilios y microvellosidades de la membrana de las neuronas receptoras olfativas (ORNs), ubicadas en la superficie del epitelio olfatorio (DeMaria & Ngai, 2010). Esta unión genera una cascada de respuestas que son mediadas por proteína G, activando la adenilato ciclasa del tipo III (AC III), lo que conlleva a un aumento del cAMP ciliar. Posteriormente, comienza la apertura de los canales iónicos activados por nucleótidos (CNG), lo que provoca una entrada de cationes (Na^+ y Ca^{2+}). Al entrar Ca^{2+} al lumen del cilio, se abren los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , y comienza a salir Cl^- , aumentando aún más la despolarización hasta generar potenciales de acción (Reisert & Zhao, 2011; DeMaria & Ngai, 2010; Kleene, 2008).

Adaptación olfatoria.

El Ca^{2+} también tiene un rol importante siendo el mensajero de la adaptación olfatoria. Esto ocurre cuando se estimula de manera prolongada o por períodos acotados de tiempo. La adaptación olfatoria puede ser dividida en dos categorías: de *acción rápida* y *acción tardía*. La adaptación de *acción rápida* es la que proviene de los canales CNG y al aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular se reduce la sensibilidad de los canales de CNG a los nucleótidos cíclicos (cAMP) a través de una interacción entre el canal iónico activado por nucleótidos y la calmodulina. Por otro lado, la adaptación de *acción lenta*, ocurre cuando el Ca^{2+} que entró por el canal CNG, activa una proteína quinasa dependiente de calmodulina que comienza a fosforilar AC III, haciendo que disminuya la actividad del cAMP (Matthews & Reisert, 2003).

Característica de la respuesta fisiológica.

El electroolfatograma (EOG) es una técnica que se usa para medir y registrar la actividad eléctrica de un grupo de neuronas receptoras olfativas desde la mucosa olfatoria. Este método en su forma más básica, consta en registrar un potencial negativo monofásico evocado por un odorante en la región sensorial de la mucosa nasal (Evans & Hara, 1985). Este potencial representa la actividad de los canales activados por

nucleótidos cíclicos (CNG) y de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} en el proceso de la transducción de un odorante en peces (Osorio & Schmachtenberg, 2013).

Se han reportado estudios realizados con registros electrofisiológicos que demuestran que los peces son sensibles a bajas concentraciones de aminoácidos (encontrándose en un umbral de 10^{-9}) (Bone & More, 2008). Los aminoácidos, son considerados odorantes que indican presencia de alimentos, dado a la respuesta conductual que presentan los peces cuando se ven enfrentados a estos estímulos (Hara & Zhang, 1998; Nikonov & Caprio, 2007). Un método utilizado regularmente para supervisar los efectos dañinos de los contaminantes en el sistema olfatorio es considerar cómo la respuesta de EOG varía dependiendo de la exposición a los contaminantes. Una de las ventajas que tiene realizar EOG, es que estos se pueden realizar *in vivo* lo que permite manipular ciertas condiciones (como la temperatura) para realizar los experimentos, además de usar las dos cavidades nasales para realizar experimentos.

Implicancias de los derrames de petróleo sobre animales marinos.

Los derrames de petróleo crudo constituyen una fuente importante de contaminación con efectos adversos. Se estima que el flujo anual de petróleo que llega al océano se encuentra probablemente entre los 5 y 10 millones de ton (Blumer, 1971; Heras, *et al.* 1992; Tesorio, 2013). El petróleo flota tanto en agua salada como dulce, propagándose rápidamente a través de la superficie del agua, formando una mancha de aceite, que a medida que pasa el tiempo, va abarcando una mayor superficie. El crudo puede entrar en contacto con superficies marinas de diversas maneras como los accidentes en alta mar o cerca de las costas, pérdidas durante la exploración y producción, almacenamiento en interrupciones del suministro, entre otras. Cuando entra en contacto con el agua y sedimento, el petróleo comienza a sufrir alteraciones químicas, físicas y biológicas, que incluyen la propagación y el movimiento por el viento y las corrientes, la evaporación de componentes volátiles, la dispersión del petróleo en el agua, la disolución y la oxidación química (Nelson & Smith, 1972). Los aceites que componen el petróleo crudo son mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos y las cantidades de cada compuesto son diferentes en cada tipo de petróleo crudo, aunque la mayoría contienen los mismos hidrocarburos aromáticos (Neff *et al.*, 1976). La variación de las propiedades del crudo define su comportamiento y destino cuando se derrama y

éste también determina su impacto en la vida marina y recursos biológicos (Tesorio, 2013).

Animales de todas las especies mueren regularmente a causa de estos derrames. Aves y mamíferos marinos son también sensibles a la contaminación por derrames de petróleo, ya que se sofocan con el aceite insoluble que queda en la superficie. En cambio, la mayoría de los peces evitan la parte insoluble nadando a aguas más alejadas, pero la fracción soluble en agua (FSA-PC) difunde en aguas más profundas pudiendo afectar en gran medida a los peces (Jones & Reynolds, 1997), si estos no reciben la información sensorial adecuada (Blumer, 1971) teniendo en cuenta que la presencia de hidrocarburos de petróleo en ambientes acuáticos constituye una fuente adicional de estrés para los organismos (Omeregíe & Ufodike, 2000). Los hidrocarburos saturados y aromáticos junto con otros elementos sulfurados y nitrogenados son los que componen la compleja mezcla de la FSA-PC, siendo los responsables de provocar la toxicidad del petróleo crudo, tanto así que a altas concentraciones su toxicidad conduce a la muerte de forma inmediata o en cuestión de minutos y horas. (Blumer, 1971; Anderson *et al*, 1974; Akaishi *et al*, 2004; Lari *et al*, 2015).

Se tiene conocimiento previo según Solangi y Overstreet (1982) de que el petróleo y su fracción soluble causan daños patológicos en las agallas, órgano olfatorio y otros órganos y tejidos de la mayoría de los animales marinos que entran en contacto con este compuesto. Los daños que provoca la exposición a largo plazo del animal a la FSA-PC a bajas concentraciones en el organismo son la anestesia, narcosis y/o la asfixia, comportamiento anormal, reducción de los quimiorreceptores, incluso la muerte del animal (Blumer, 1971). Uno de los efectos a largo plazo se relaciona directamente con que la mayoría de los hidrocarburos son cancerígenos, aumentando el riesgo de neoplasia en cualquier tejido expuesto a la FSA-PC (Xue & Warshwsky, 2005; Blumer, 1971; Haensly *et al*, 1982). Estudios realizados por Heras *et al*, (1992) demostró que los salmones absorben hidrocarburos en un período corto de tiempo sin tener efectos letales y que no muestran signos de toxicidad y se les considera que al ser peces grasos retienen la contaminación por períodos más prolongados, en comparación con las especies de tejidos magros. Otro estudio realizado mediante técnicas electrofisiológicas, usando como modelo de estudio el bacalao (*Gadus morhua*), se pudo demostrar que los hidrocarburos del petróleo eran detectados a concentraciones de 0.0001 ppm (Bohle,

1986) y además, recientemente se demostró que las carpas del Mar Caspio (*Rutilus caspicus*) son capaces de detectar y evitar 2 mg/L de la FSA-PC, presumiblemente por el olfato (Lari et al, 2015).

Planteamiento del problema.

A pesar de las grandes cantidades de petróleo crudo que contaminan las aguas cada año (Blumer, 1971) y sin ir más lejos han ocurrido grandes derrames en la comunidad de Quintero, Región de Valparaíso, la literatura sobre los efectos negativos del petróleo crudo en peces es muy limitada y antigua (Solangi & Overstreet, 1982).

En este proyecto se analizarán las respuestas olfatorias a distintas diluciones de la fracción soluble del petróleo crudo, mediante registros electrofisiológicos (electroolfatograma, EOG) en el epitelio del órgano olfatorio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*. Se verificará también si la exposición a corto y largo plazo a la FSA-PC afecta negativamente la respuesta de odorantes conocidos, realizando también cortes histológicos del órgano olfatorio para observar las posibles alteraciones que puedan poner en riesgo la vida del animal y la mezcla de un odorante estándar con FSA-PC para observar la capacidad de detección del animal.

HIPOTESIS DEL ESTUDIO.

La fracción soluble en agua del petróleo crudo (FSA-PC), es detectable de manera dosis-dependiente por el olfato en salmónidos. Además, la exposición a la fracción soluble en agua del petróleo crudo y a altas concentraciones de ésta inhibe las respuestas olfatorias a nivel del órgano olfatorio de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la potencia olfatoria de la FSA-PC a diferentes diluciones y su efecto sobre las respuestas olfatorias a un odorante estándar en la trucha arcoíris.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Cuantificar la relación dosis-respuesta de la fracción soluble en agua del crudo en trucha arcoíris por medio de registros de electroolfatograma (EOG).
2. Evaluar la potencia olfatoria de FSA-PC en comparación con odorantes estándares, como L-Serina a 100 μM .
3. Determinar si la perfusión inmediata, a corto (45 minutos) y largo plazo (24 horas) de la roseta olfatoria con FSA-PC 1:10⁴ y 1:100, respectivamente, afecta la detección de L-Serina a 100 μM .
4. Observar mediante cortes histológicos si la perfusión prolongada de FSA-PC provoca un potencial daño a nivel epitelial en el órgano olfatorio.

MATERIALES Y METODOS.

Este trabajo de investigación se realizó durante el año 2016 en las dependencias del Centro Interdisciplinario de Neurociencias Valparaíso (CINV), Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile. Los métodos utilizados están de acuerdo con los principios bioéticos delineados por CONICYT para trabajo de experimentación y se realizarán de la manera menos invasiva posible.

Animales. Juveniles de truchas arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, de ambos sexos fueron obtenidos de una piscicultura científica en Río Blanco, Los Andes (www.pisciculturarioblanco.ucv.cl) en Agosto de 2016, siendo mantenidas en agua declorinada y filtrada a una temperatura ambiente de 20 °C en las instalaciones para animales de experimentación de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. El peso promedio de las truchas utilizadas fue de 59.27 g. Para comenzar los experimentos fueron previamente anestesiadas con MS-222 (tricaine methane sulfonate, 100 mg/L) (Zahl et al, 2012) y luego de unos minutos inmovilizadas con una inyección intramuscular en la aleta dorsal de Flaxedil (gallamine triethiodide, 0.3 mg/Kg de peso corporal). Se inyectaron dosis de mantención de Flaxedil durante el transcurso de la experimentación, según su requerimiento. Una vez finalizado los experimentos, se realiza la eutanasia de los peces de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso inyectándole una sobredosis de Flaxedil en la aleta dorsal y posterior a esto, decapitando al animal.

Montaje de la trucha en la cámara de registro de EOG. Con el animal previamente anestesiado y paralizado, la trucha fue montada en una cámara de registro a la cual se le inserta una manguera en la boca para poder proveerlo de agua declorinada, oxigenada y filtrada (con 100 mg/L de MS-222). Se realizó una cirugía para exponer la roseta olfatoria bajo anestesia local con lidocaína, intentando ser lo menos invasivo. Al estar la roseta olfatoria expuesta, se posicionó un electrodo Ag-AgCl de registro en el rafe, directamente en el centro de la roseta olfatoria y además uno de referencia cercano al lugar de la cirugía. Junto al electrodo de registro va una pipeta de estimulación de boro-silicato, que permite la liberación de los odorantes en la cavidad nasal y además, cumple la función de mantener la roseta humedecida. La pipeta queda siempre levemente por sobre el electrodo de estimulación para que la distribución del odorante sea lo más

homogénea posible. El agua junto a los estímulos circula dentro del sistema, es decir, sólo entra por la boca del animal y en ningún momento ésta entra en contacto con el órgano olfatorio. La roseta es lavada y humedecida constantemente con agua declorinada y filtrada con un sistema aparte que no entra en contacto con el agua del sistema.

Protocolo de estimulación. La señal obtenida en modo DC, es amplificada (A-M System Extracellular AC/DC diferencial amplifier), digitalizada (interfase Axon Instruments MiniDigi) y visualizada con el Software AxoScope (Axon Instruments). Los estímulos se aplicaron manualmente con una micropipeta de 200 μL . Se utilizó L-Serina (a 100 μM) como control positivo y agua obtenida del bioterio como control de vehículo. Para calcular las concentraciones finales efectivas, se determina el factor de dilución con los odorantes más potentes, en este caso L-Serina, como se detalla en Valdés *et al*, 2015. El intervalo de estimulación para L-Serina a 100 μM , control de vehículo y las diluciones de FSA-PC fueron de un minuto para evitar la adaptación de las ORNs. Inicialmente se estimula con ambos controles (positivo y de vehículo), para luego comenzar a estimular con las diluciones de FSA-PC intercalando entre ellas estímulos de L-Serina a 100 μM . Al finalizar el protocolo de estimulación, la roseta se perfunde por 45 minutos con la dilución seriada 1:10⁴ de FSA-PC, y posteriormente se estimula con L-Serina a 100 μM para observar daño epitelial a corto plazo. Después de realizada esta acción, se perfunde sólo con agua por otros 45 minutos y se vuelve a estimular con L-Serina a 100 μM . Se realiza también la perfusión por 24 horas del pez en un acuario, previamente equipado con todo lo necesario para que el pez se encuentre en condiciones óptimas, con FSA-PC (1:100). En un animal distinto, se realiza la perfusión por 24 horas, se monta en la cámara de registro y se estimula con L-Serina a 100 μM , como se realizó anteriormente. Para finalizar el protocolo de estimulación se realizan estímulos de L-Serina a 100 μM en FSA-PC (1:10; 1:100; 1:10³; 1:10⁴ y 1:10⁵) y se procede a estimular de menor a mayor concentración y viceversa.

Preparación de diluciones de petróleo crudo. La muestra utilizada corresponde a la carga que alimenta la Planta de Topping N°2 (Destilación Atmosférica). La muestra en cuestión fue tomada el 15 de Noviembre del 2015 y corresponde a una mezcla de 4 crudos y un pequeño porcentaje de Slop, que son productos fuera de especificación. Las

distintas cepas de crudo provienen de Lula, Brasil (62.5%); Oriente, Medio Oriente (20.4%); Napo, Ecuador (14.3%); Sapinhoa, Brasil (1.5%) y en un 1.3% de Slop.

Las disoluciones se prepararon según el método de *Anderson et al. (1974)* descrito a continuación: En una botella de vidrio se introducen 100 mL de petróleo crudo y 900 mL de agua (TW), con un agitador magnético se lleva a una manta agitadora por 24 horas a temperatura ambiente (20 °C) para que la mezcla se homogenice de la mejor manera posible. Se estima que la evaporación de hidrocarburos es mínima, porque la botella se mantiene en todo momento cerrada y con Parafilm. Se deja reposar la botella de vidrio con el contenido de interés aproximadamente cuatro horas y el contenido se extrae mediante sifonadas la FSA-PC, para ser almacenadas en tubos de centrifuga de 50 mL y posteriormente refrigeradas a 4°C. A partir de estas alícuotas, que están a una dilución inicial 1:10, se obtendrán diluciones seriadas de 1:100, 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵ en 10 mL de agua. La dilución 1:10 se utilizará directamente de la alícuota para realizar las estimulaciones correspondientes.

Preparación de los estímulos de L-Serina a 100 μM. Se preparan disoluciones de stock de 10 mM, disueltas en agua, para luego ser alicuotadas en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (alícuotas de 1 mL) y guardadas en el refrigerador a -40 °C.

Criosecciones del órgano olfatorio: Al sacrificar al animal después de finalizar los registros electrofisiológicos, se extraen cuidadosamente las rosetas olfatorias bajo lupa (Nikon SMZ 21500) intentando no dañar tejido, se dejan en tubos de centrifuga de 2 mL con paraformaldehído (PFA) al 4%. Al momento de ser utilizadas se deben realizar 2 lavados de 20 minutos cada uno con PBS 1% (tampón fosfato salino) y se deja por 24 horas en una solución de sacarosa 30%, para luego crear un molde con *Tissue tek* (Diagnostic Division, Elkhart, IN), siendo un medio de montaje usado para realizar cortes histológicos (O.C.T.TM). Los cortes fueron realizados en el crióstato (Leica CM1900) a un grosor de 35 μm siendo adheridos a un portaobjeto previamente tratado. El tratamiento realizado a los portaobjetos fue limpiarlos con alcohol al 100% para luego agregar de forma uniforme y en dos oportunidades 20 μL poli-D-lisina, que es un compuesto sintético que mejora la adhesión celular y la absorción de proteínas alterando las cargas superficiales. Las criosecciones fueron secadas al aire para su posterior tinción con *hematoxilina-eosina* (*Zhang et al, 1997*).

Para la tinción del tejido con *hematoxilina-eosina*, las muestras se deben hidratar en multi-pocillos que cubren todo el portaobjeto con agua por 10 minutos, se retira el agua y en otro pocillo completamente seco, se dejan sumergidas por 30 segundos en hematoxilina y se lavan por aproximadamente 15 minutos con agua o hasta que el agua quede completamente transparente. Después de realizar los lavados, las muestras se dejan cubiertas durante un minuto en eosina. Luego comienza el proceso de deshidratación que consta de dos lavados de 5 minutos cada uno con *etanol 95%*, *etanol absoluto* y *xilol*. Y finalmente fueron fijados con *entellan* (Merck), un medio de montaje libre de agua y de pegado rápido usado para microscopía. Las muestras fueron observadas a un aumento de 40x en un microscopio de fluorescencia (LEICA DMR) y fotografiadas con una cámara LEICA DFC 480.

Análisis de datos. Los resultados se muestran como un promedio de la amplitud de un mínimo de 3 registros de EOG, lo que quiere decir que se realizaron varios estímulos repetidos de un mismo odorante (respetando el intervalo de tiempo de un minuto) para finalmente promediarlos. Las señales se analizan con el Software Clampfit (version 10.0.0.61), filtradas usando un filtro pasa baja del tipo gaussiano a 10 Hz y son graficadas y analizadas en Prisma Graph Prism 7 Software. La distribución de los datos fue testeada con Shapiro-Wilk, para determinar si presentaban una distribución normal. Si este era el caso, se aplicó one-way ANOVA o t de student no pareado. En los casos donde los datos no presentaron una distribución normal, se utilizó Kruskal-Wallis. Los datos fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS.

Se determinó la potencia olfatoria de la FSA-PC a diferentes diluciones y sus efectos sobre las respuestas olfatorias a L-Serina a 100 μM en *Oncorhynchus mykiss*. Antes de estimular con la FSA-PC es necesario realizar un control positivo con un odorante estandarizado para comprobar que el electrodo esté bien posicionado en la roseta olfatoria y si genera algún tipo de artefacto eléctrico o respuesta. Además, se realiza un control de vehículo con agua para corroborar que ésta no modifica la respuesta de los estímulos.

Comparación de controles. Los controles se realizan con estimulación manual de 200 μL de L-Serina a 100 μM y agua como control positivo y de vehículo, respectivamente. Se comparó la amplitud de las respuestas de los dos controles realizados al comienzo de cada experimento (Figura 1) y los registros representativos de cada respuesta al estimular con ambos controles se muestra en la Figura 2.

Control positivo vs Control de vehículo.

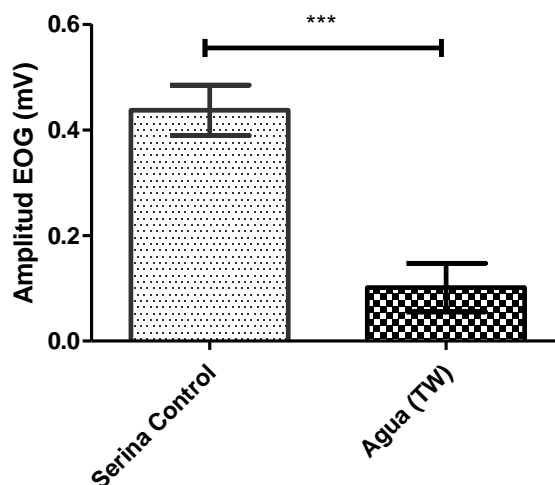


Figura 1: Comparación de la amplitud del EOG en respuesta a estímulos controles en *Oncorhynchus mykiss*. De izquierda a derecha se encuentra el control positivo 200 μL de L-Serina a 100 μM y el control de vehículo con agua. Se muestra el valor promedio de la amplitud ($n = 16$). Las barras de error representan el error estándar. ($p < 0.001$, t-test no pareado).

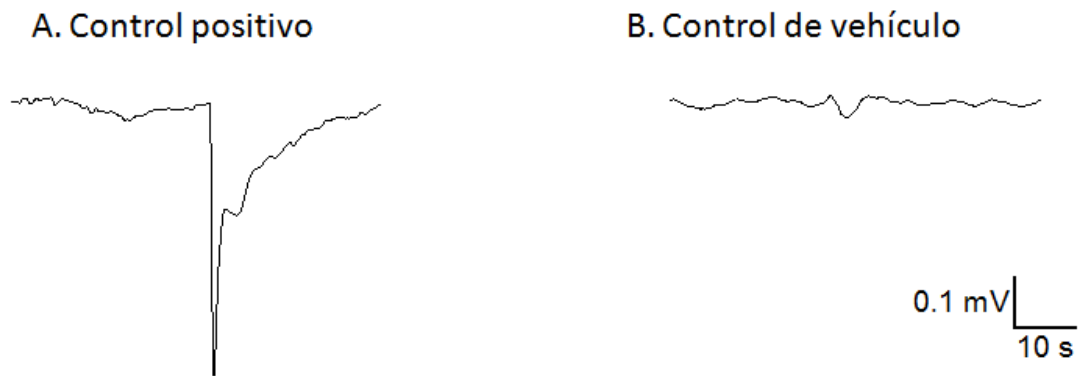


Figura 2: Registros representativos de EOG frente a estímulos controles en trucha arcoíris. **A.** Control positivo con 200 μL de L-Serina a 100 μM . **B.** Control de vehículo con 200 μL de agua. Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

Respuesta a las distintas diluciones de FSA-PC. Después de haber estimulado con los odorantes controles, se procede a estimular la roseta olfatoria con las distintas diluciones de FSA-PC (1:10; 1:100; 1:10³; 1:10⁴ y 1:10⁵) para verificar si la FSA-PC se puede considerar un olor para la trucha. Como se observa en la Figura 3 todas las diluciones seriadas generaron respuesta, aunque cada una con distinta cinética y amplitud. Las respuestas de las diluciones 1:10⁵; 1:10⁴; 1:10³ y 1:100 son muy similares con respecto a su cinética y amplitud (Figura 4).

Amplitud del EOG en respuesta a diluciones seriadas de FSA-PC

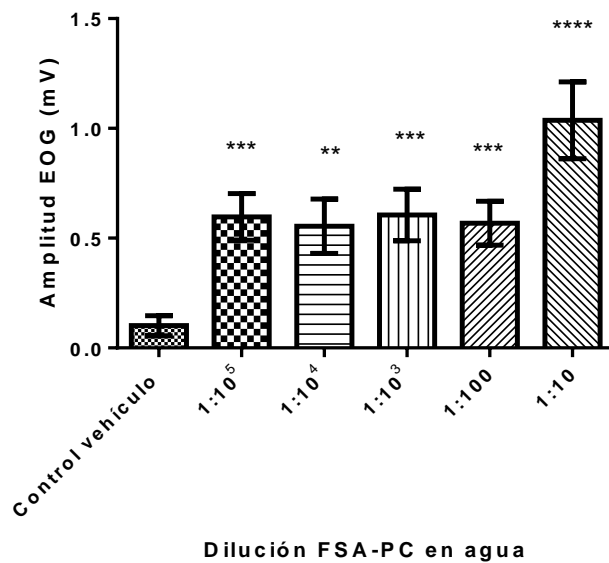


Figura 3: Respuestas de los registros de EOG a las distintas diluciones seriadas de FSA-PC. De izquierda a derecha se encuentra el control de vehículo y luego las diluciones de FSA-PC que van en orden creciente (desde la menos concentrada a la más concentrada). Se muestra el valor de las medianas ($n = 16$). Las barras de error representan el error estándar ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis test; Dunn's post test).

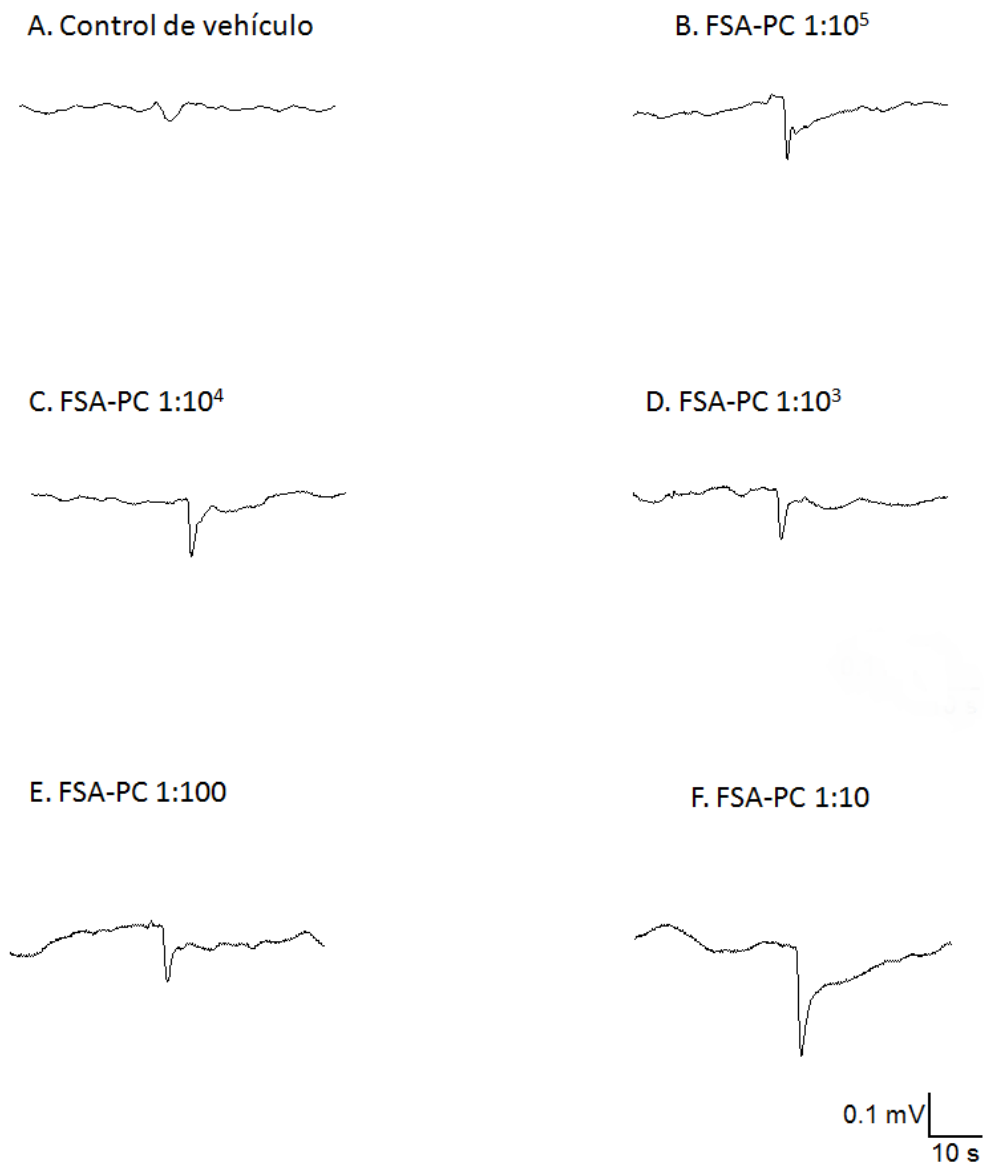


Figura 4: Registros de EOG representativos a las distintas diluciones de FSA-PC de menor a mayor concentración. **A.** Estímulo de 200 μ L de agua. **B.** Dilución de FSA-PC 1:10⁵. **C.** 1:10⁴. **D.** 1:10³. **E.** 1:100. **F.** 1:10. Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

En la Figura 5 se puede apreciar una curva dosis-respuesta de las diluciones de FSA-PC en donde se observa la respuesta de EOG, pudiendo determinar de esta forma la concentración mínima de detección de la trucha arcoíris.

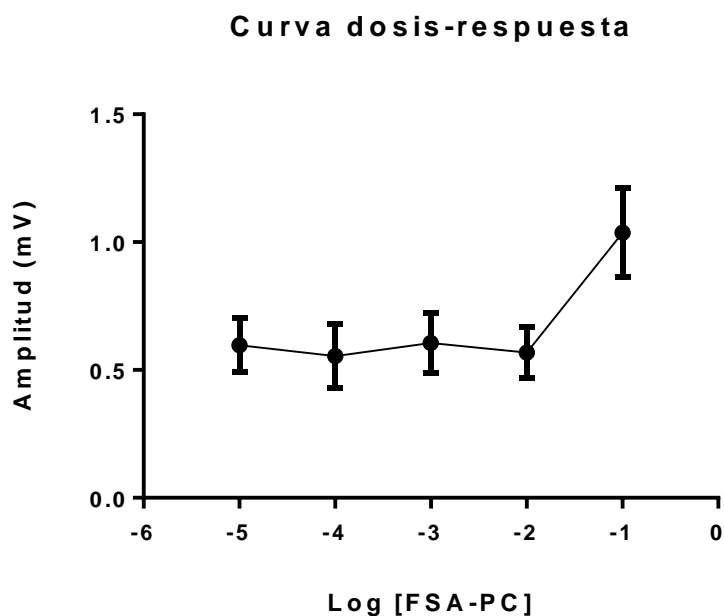


Figura 5: Curva dosis-respuesta de las diluciones de la fracción soluble en agua del petróleo crudo (FSA-PC). Valores promedio de un $n = 16$. Barras de error representan el error estándar.

Respuestas de L-Serina a $100 \mu\text{M}$ realizados después de haber estimulado con las distintas diluciones de FSA-PC. Para determinar si la FSA-PC tiene un efecto inmediato se intercalan los estímulos de FSA-PC a las distintas diluciones con L-Serina. En la Figura 6 se observa que la amplitud de la respuesta de L-Serina después del estímulo de FSA-PC $1:10^5$ comienza a aumentar paulatinamente a medida que se aumenta la concentración de FSA-PC. En la Figura 7, se pueden apreciar los registros representativos y se observa cómo la respuesta de L-Serina va cambiando su amplitud y cinética a medida que va en aumento la concentración de las diluciones de FSA-PC.

Respuesta a Serina después de las diluciones seriadas de FSA-PC

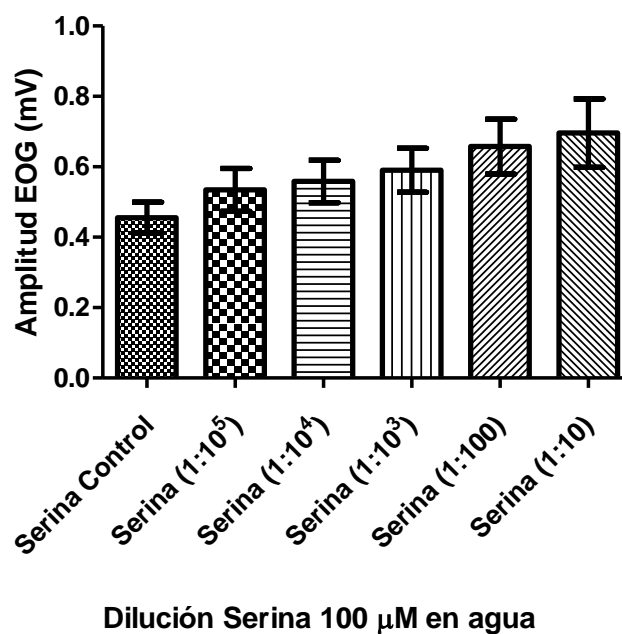


Figura 6: Respuestas de EOG a L-Serina después de estimular con las diluciones de FSA-PC. De izquierda a derecha se encuentra L-Serina Control y luego las diluciones de FSA-PC en orden creciente de concentración. Se muestran los registros promedios ($n = 20$) y las barras que representan el error estándar. No se observan diferencias significativas ($p=0,05$; One-way ANOVA). **VER ANALISIS NUEVAMENTE.**

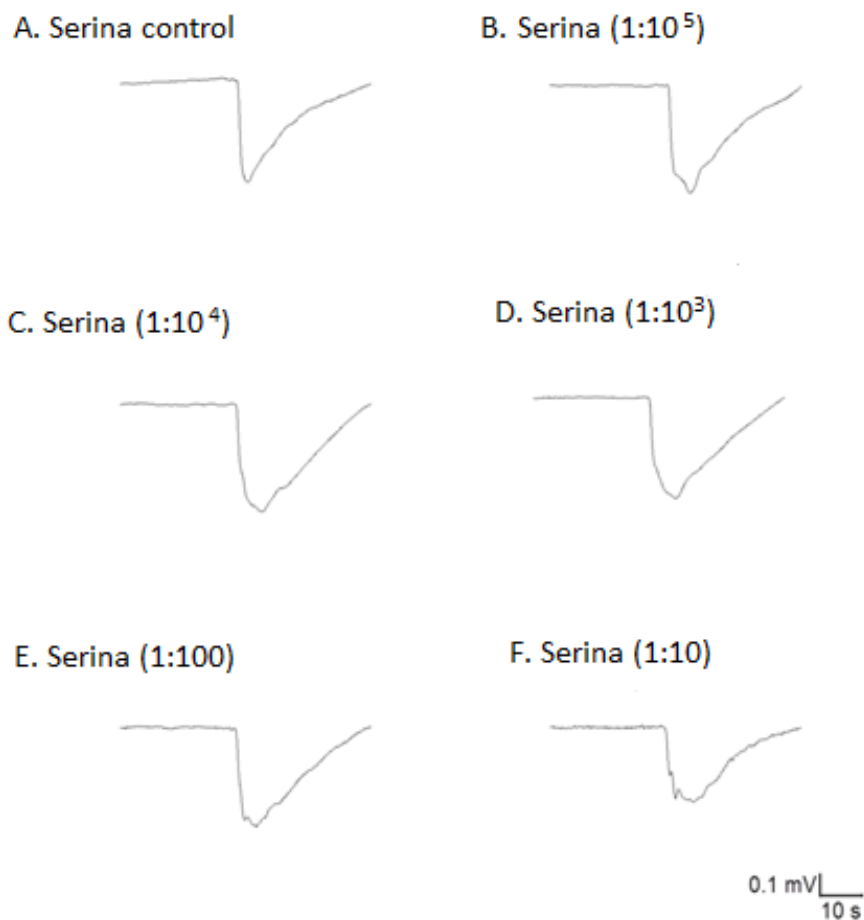


Figura 7: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina después de haber estimulado con las diluciones de FSA-PC en trucha arcoíris. **A.** Estimulación de 200 μ L de L-Serina a 100 μ M (control positivo). **B.** 200 μ L de L-Serina a 100 μ M después de haber estimulado con la dilución 1:10⁵ de FSA-PC. **C.** 1:10⁴. **D.** 1:10³. **E.** 1:100. **F.** 1:10. Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

Respuestas de L-Serina a 100 μ M frente a perfusiones prolongadas de FSA-PC. Una vez terminado los experimentos de dilución seriada, se perfunde la roseta olfatoria con una dilución de FSA-PC (1:10⁴) por 45 minutos para verificar si existe daño a corto plazo en la detección de odorantes. Cuando se cumple el tiempo estimado se estimula con 200 μ L de L-Serina a 100 μ M. Finalmente se limpia la roseta por 45 minutos con agua para observar si existe algún tipo de recuperación en la respuesta o si se mantiene

la respuesta, en comparación con la perfusión de FSA-PC (1:10⁴). Transcurridos los 45 minutos se vuelve a estimular con L-Serina a 100 μ M. Como se observa en la Figura 8, hubo una disminución no significativa de la respuesta luego de haber perfundido la roseta por 45 minutos con una dilución a 1:10⁴. Tampoco se observa alguna recuperación de la respuesta luego de haber limpiado la roseta con agua.

En las dependencias del bioterio se simula un derrame de petróleo a una dilución de 1:100 y se dejan truchas que no han sido utilizadas previamente para realizar experimentos, expuestas por 24 horas. Pasado el tiempo estipulado, la trucha se monta en la cámara de registro y se estimula con L-Serina a 100 μ M para observar si hay daño en la roseta olfatoria. No se realizó perfusión de limpieza con agua por 24 horas, ya que ningún animal sobrevivió a la anestesia aplicada. En la Figura 8 se observa que también hubo una disminución en la amplitud en comparación con la respuesta control, pero esta disminución de la respuesta no fue significativa.

Serina perfusión FSA-PC vs Serina perfusión agua

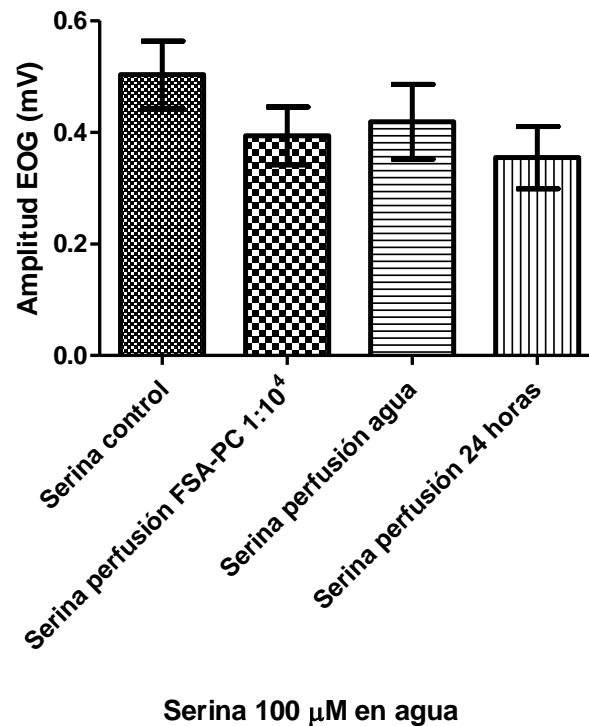


Figura 8: Respuesta de EOG a estímulos de L-Serina a 100 μM después de las perfusiones realizadas en la trucha arcoíris. De izquierda a derecha se encuentra L-Serina control, la respuesta a L-Serina después de la perfusión de 45 minutos con la dilución de FSA-PC (1:10⁴), respuesta a L-Serina después de la perfusión de limpieza (45 minutos) con agua. La última barra (de izquierda a derecha) se muestra la respuesta a L-Serina después de la perfusión por 24 horas de la FSA-PC (1:100), en un animal distinto. Los valores promedio para ambos casos es de un n=5. Se muestran los valores promedio para cada condición (n= 5). Las barras verticales representan el error estándar. No hay diferencias significativas (One-way ANOVA; p=0,05).

A. Serina Control



B. Serina perfusión 1:10⁴



C. Serina perfusión agua



D. Serina perfusión 1:100



0.1 mV |
10 s

Figura 9: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina después de haber realizado las perfusiones en la trucha arcoíris. **A.** Estimulación de 200 μL de L-Serina a 100 μM (control positivo). **B.** 200 μL de L-Serina a 100 μM después de haber perfundido la roseta por 45 minutos con la FSA-PC (1:10⁴). **C.** Respuesta a L-Serina después de haber perfundido por 45 minutos con agua. **D.** Respuesta a L-Serina después de haber perfundido por 24 horas con una dilución de FSA-PC (1:100). Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

Estímulos de L-Serina a 100 μM en las distintas diluciones de FSA-PC, orden de estimular de menor a mayor concentración. Se realizan estimulaciones en orden creciente para observar si L-Serina a 100 μM mezclada con agua contaminada afectan la detección de odorantes en la trucha arcoíris tanto en amplitud como en la cinética de ésta. En la Figura 10 se puede observar que aumenta levemente la amplitud de la respuesta de L-Serina en 1:10⁴ y L-Serina en 1:10 con respecto a L-Serina control y en la Figura 11 se puede observar los registros representativos de cada EOG y verificar cómo cambia la cinética y amplitud de cada respuesta al estar mezclada con

contaminantes (L-Serina a 100 μM en las distintas diluciones de FSA-PC). El aumento en la amplitud no es estadísticamente significativo.

Estimulación Serina en FSA-PC de menor a mayor concentración.

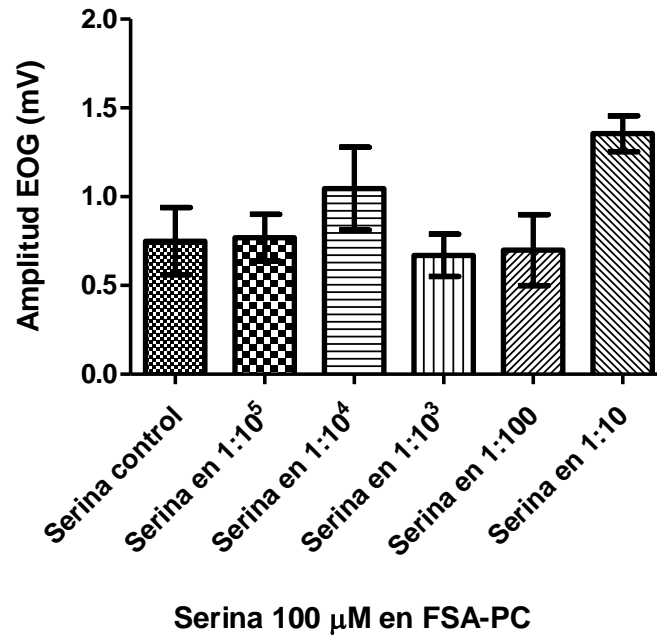


Figura 10: Respuesta de EOG a L-Serina a 100 μM en las distintas diluciones de FSA-PC (estimulación creciente). De izquierda a derecha se encuentra L-Serina control y luego los estímulos de L-Serina en las diluciones de FSA-PC. Valores promedio de un $n = 7$. Barras de error representan el error estándar. No se observan diferencias (One-way ANOVA; $p=0,05$).

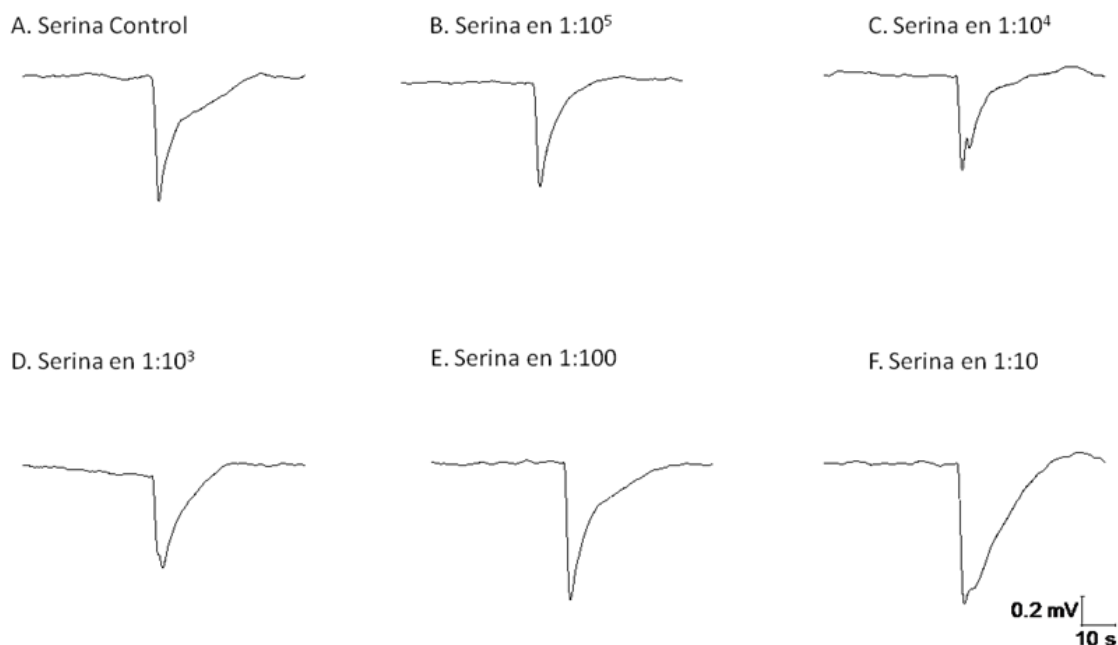


Figura 11: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina a $100 \mu\text{M}$ en las distintas diluciones de FSA-PC (Estimulación creciente) en trucha arcoíris **A.** Estimulación de $200 \mu\text{L}$ de L-Serina a $100 \mu\text{M}$ (control positivo). **B.** $200 \mu\text{L}$ de L-Serina a $100 \mu\text{M}$ en FSA-PC $1:10^5$. **C.** L-Serina en $1:10^4$. **D.** L-Serina en $1:10^3$. **E.** L-Serina en $1:100$. **F.** Serina en $1:10$. Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

Estímulos de L-Serina a $100 \mu\text{M}$ en las distintas diluciones de FSA-PC, orden de estimular de mayor a menor concentración. Luego de haber realizado la estimulación en orden creciente, se realiza el orden decreciente para observar si las altas concentraciones de contaminantes afecta la detección de odorantes en el animal. Como se observa en la Figura 12 aumenta la amplitud de la respuesta de L-Serina en la dilución $1:10$ de FSA-PC con respecto al control, mientras que las demás respuestas no tienen un aumento significativo en amplitud con respecto al control. En la Figura 13 se observa las imágenes representativas de cada respuesta para observar cómo varía la respuesta tanto en amplitud como en la cinética de ésta.

Estimulación Serina en FSA-PC de mayor a menor concentración.

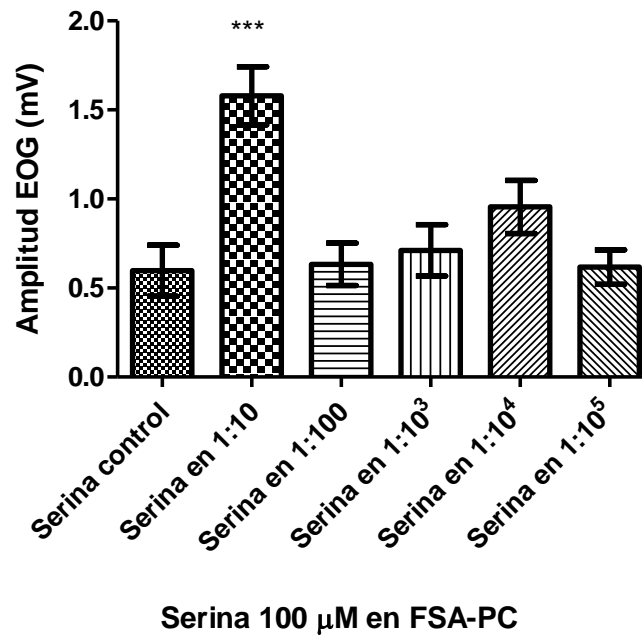


Figura 12: Respuesta de EOG a estímulos de L-Serina en diluciones seriadas de FSA-PC (estimulación decreciente). De izquierda a derecha se encuentra L-Serina control y luego los estímulos de L-Serina en las distintas diluciones de FSA-PC. Valores promedio de un $n = 8$. Las barras representan el error estándar (One-way ANOVA; Bonferroni's multiple comparison test).

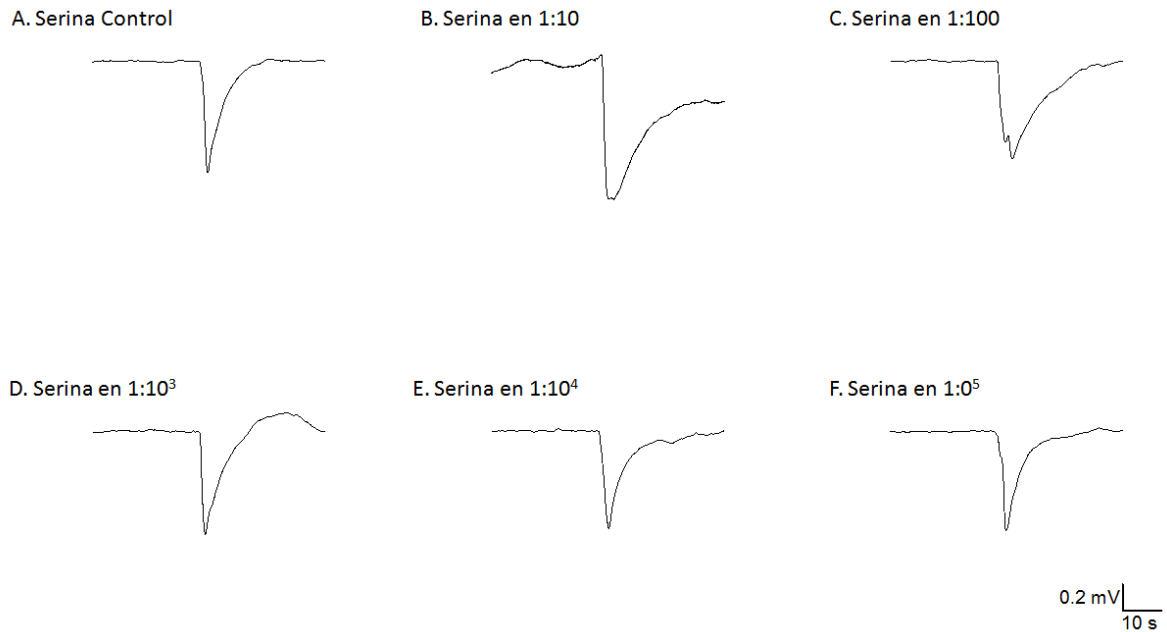


Figura 13: Imágenes representativas de los registros de EOG a L-Serina a $100\ \mu\text{M}$ en las distintas diluciones de FSA-PC (Estimulación decreciente) en trucha arcoíris. **A.** Estimulación de $200\ \mu\text{L}$ de L-Serina a $100\ \mu\text{M}$ (control positivo). **B.** $200\ \mu\text{L}$ de L-Serina a $100\ \mu\text{M}$ en FSA-PC 1:10. **C.** L-Serina en 1:100 **D.** L-Serina en $1:10^3$. **E.** L-Serina en $1:10^4$. **F.** L-Serina en $1:10^5$. Cada registro tiene una duración de un minuto y la aplicación manual del estímulo se realiza a los 30 segundos.

Criosecciones del órgano olfatorio. Después de realizar todo el protocolo de estimulación se procede a sacrificar el animal y remover con cuidado ambas rosetas olfatorias para observar si hay daño en el epitelio olfatorio y/o algún cambio morfológico que pueda verse manifestado en la microfotografía. En la Figura 14 se puede observar que hay un engrosamiento en las paredes del epitelio olfatorio después de la perfusión de 24 horas con respecto a la imagen control de la misma roseta olfatoria.

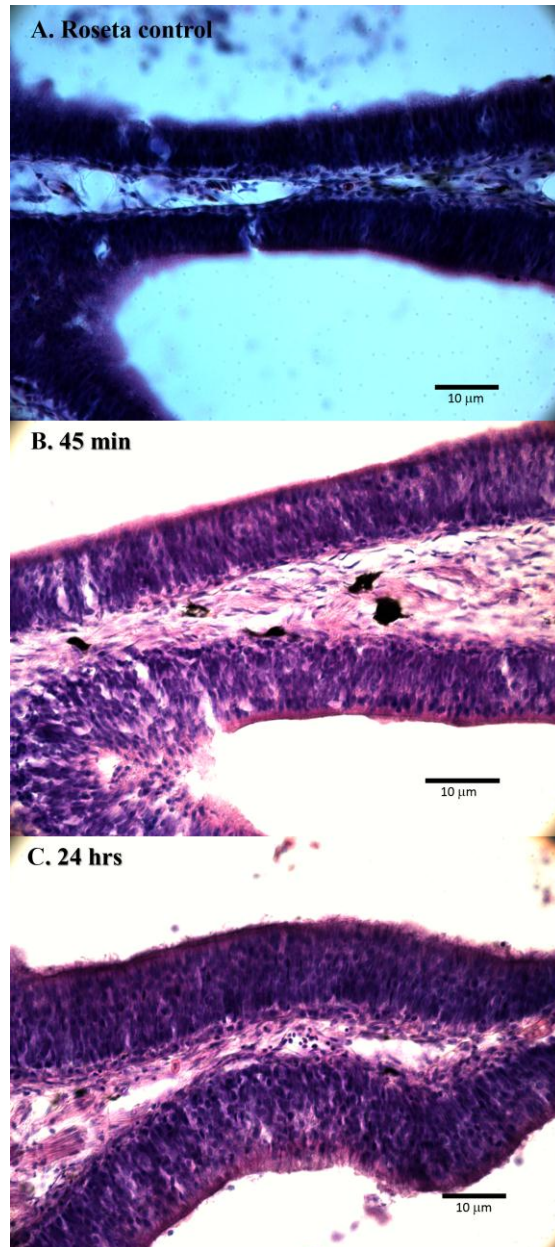


Figura 14: Criosecciones del órgano olfatorio de *Oncorhynchus mykiss* a 35 µm de grosor realizadas en el criostato. Cortes observados en microscopio de fluorescencia con objetivo 40x. Tinción de hematoxilina-eosina. **A.** Roseta control. **B.** Roseta expuesta por 45 minutos a una dilución 1:10⁴ de la FSA-PC. **C.** Roseta expuesta a 24 horas a una dilución 1:100 de la FSA-PC.

DISCUSION.

Respuesta electrofisiológica a las distintas diluciones de FSA-PC. Se presentó respuesta a todos los estímulos realizados de las distintas diluciones de FSA-PC y además todas las respuestas fueron significativas con respecto al control (1:10; 1:100; 1:10³; 1:10⁴ y 1:10⁵). Las respuestas generadas al estimular la roseta olfatoria con las diluciones 1:10⁵ a la 1:100 tuvieron una amplitud muy similar, no significativa entre ellas. Si extrapolamos la gráfica de la Figura 5 podemos decir que el pez podría llegar a percibir concentraciones de 1:10⁶ o 1:10⁷, que es una concentración muy baja. En el 2008 se reportó un estudio realizado con registros electrofisiológicos demostrando que los peces son sensibles a bajas concentraciones de aminoácidos, encontrándose inclusive en el umbral de 1:10⁹ (Bone & More, 2008). Los resultados del estudio concuerdan con lo extrapolado, ya que los aminoácidos tienen un umbral menor de detección, y se explica en parte por qué están presente en los alimentos evocando conductas relacionadas con la alimentación cuando se enfrentan a este estímulo (Hara & Zhang, 1998; Nikonov & Caprio, 2007). Es muy importante que los peces puedan percibir olores a muy bajas concentraciones, porque los salmónidos son animales migratorios y es de suma importancia para que éstos puedan reproducirse en vida silvestre (Valdés *et al*, 2015). Cuando se estimuló con la dilución de FSA-PC más concentrada (1:10) la amplitud de la respuesta fue mayor, teniendo una gran significancia en comparación con la respuesta control, este aumento de la respuesta se puede atribuir a que este estímulo tiene la parte soluble del petróleo crudo concentrada y este estímulo no está diluido como los demás. Otra alternativa es que hayan quedado trazas de hidrocarburos saturados y/o aromáticos adheridas en las mangueras o pipeta de estimulación. Cabe destacar que cuando se estimula con el control de vehículo (agua) se observa también una pequeña respuesta que se puede atribuir a que las neuronas olfatorias pierden sensibilidad pudiendo captar las feromonas, residuos de alimentos, entre otros compuestos que se encuentran en el agua usada para el control de vehículo, ya que es la misma en donde están sumergidas en las dependencias del bioterio de la Universidad.

Estudios recientes realizados en agua dulce señalan que *Cyprinus carpio* evita concentraciones relativamente altas de 2 mg/L de la fracción soluble en agua del petróleo, ya que la concentración tóxica es de 3.2 mg/L causando una reducción de la

respuesta olfatoria (Lari *et al*, 2015). Con esta tendencia, si existiera un área no contaminada para que los peces pudieran escapar, las posibilidades que tienen de detectar el área contaminada antes de llegar a la concentración tóxica disminuye, teniendo en cuenta también que la mayoría de los peces quedan atrapados en la superficie contaminada con el petróleo (Davis *et al*, 2002) demostrando que hay un efecto negativo en las funciones olfatorias, pero no se puede expandir el mismo daño a todo el sistema, ya que se ha demostrado que el petróleo a distintas concentraciones puede inducir diferentes niveles de deterioro en la función olfatoria (Dew *et al*, 2014). Debemos tener en cuenta que nuestro estudio se realizó en agua dulce, en donde la solubilidad es mucho mayor y los derrames de petróleo no son tan relevantes como los que suceden en agua de mar. Por ejemplo, un material que tenga una baja solubilidad en agua, como lo es el petróleo, tendrá una solubilidad aún menor si la capa acuosa contiene una gran cantidad de cloruro de sodio. Esto se debe a que los grupos funcionales estarán implicados en la estabilización y solvatación de los iones sodio y cloruro, y por ende, serán inasequibles para la solvatación de aquellos grupos funciones que están contenidos en el petróleo (Durst & Gokel, 2007).

En general, nuestros resultados sugieren que el salmón juvenil evitaría las concentraciones letales agudas de hidrocarburos aromáticos monocíclicos presentados individualmente. Sin embargo, existe alguna duda sobre si evitarían concentraciones tóxicas de estos compuestos que se encuentran en la FSA-PC y qué diferencia tendría este mismo estudio pero realizado en agua de mar, ya que la solubilidad del petróleo cambia. Se debe tener en cuenta que no hay información publicada sobre el comportamiento y la toxicidad después de una exposición crónica de bajo nivel o sobre las consecuencias del rechazo a este contaminante, en particular si esta acción da lugar a un cambio de hábitat.

Respuestas de L-Serina a 100 μ M. Como se muestra en la Figura 6 hubo respuesta en todos los estímulos de L-Serina a 100 μ M, aunque ninguna de las respuestas fue significativa con respecto al control. La hipótesis planteada en esta investigación daba cuenta de que la respuesta se iba a ver disminuida con la exposición a la FSA-PC, ya que hay estudios que demuestran que los componentes del petróleo causan una

reducción de la tasa de alimentación en diferentes peces (Carls, 1987). Los resultados obtenidos en esta investigación dicen lo contrario, la respuesta paulatinamente va en aumento, aunque no estadísticamente significativa. Los resultados de la investigación de Lari *et al*, 2015 demuestran claramente que la disfunción olfatoria causada por la FSA-PC es la supresión de la conducta alimentaria, ya que la contaminación con hidrocarburos puede reducir la capacidad de *nadar rápido*, por tanto, podría verse afectada la alimentación y la correcta migración del pez (Gonçalves *et al*, 2008). Curiosamente, los peces expuestos durante 8 días mostraron un aumento en la respuesta al alimento en comparación con el día 4 (Lari *et al*, 2015). Esta mejora observada sugiere que mecanismos de recuperación se han activado. Una de las hipótesis es que al aumentar las concentraciones de hidrocarburos, se activan las proteínas del citocromo P450, que ayudan a metabolizar y desintoxicar estos contaminantes (Arukwe *et al*, 2008). Como estuvo sólo un par de minutos expuesto a las diferentes diluciones de FSA-PC, se puede haber generado alguna respuesta sinérgica entre los componentes del petróleo (Malins, 1982), ya que hay estudios que indican que en el estado juvenil del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) evitaría las concentraciones letales de hidrocarburos aromáticos, pero no la mezcla de ellos en agua dulce, como lo es la FSA-PC (Maynard & Weber, 1981). Otro factor determinante en los resultados obtenidos pudo ser el modelo animal utilizado, puesto que en la mayoría de las investigaciones usando peces magros, en comparación con los salmones y se sabe que éstos retienen mayores cantidades de contaminantes sin mostrar cambios negativos (Heras, 1992).

Al mezclar L-Serina a 100 μM con las distintas diluciones de FSA-PC, la estimulación creciente no tuvo resultados significativos (Figura 10), lo que quiere decir es que el pez pudo detectar la presencia de L-Serina, pero la Figura 11 en donde están representado cada registro de EOG se muestra que cambia la amplitud y cinética de la respuesta, lo que nos podría indicar que la contaminación modifica la respuesta de L-Serina. En cambio, cuando se estimula de forma decreciente (Figura 12), la respuesta de L-Serina en 1:10 es significativa con respecto a la respuesta de L-Serina control, lo que podría significar que el olor del contaminante es dominante frente al olor de L-Serina.

Los derrames de petróleo podrían afectar el *homing* de los salmonidos, afectando principalmente la capacidad olfatoria del animal, dañando el lugar en donde ocurre la transducción del olfato. Otra de las probabilidades es dar *falsas alarmas*, es decir, que

los hidrocarburos de alguna forma enmascaren los olores que son de vital importancia como olores de alimento y feromonas (Nakatani & Nevessi, 1991). La exposición a corto (45 minutos; dilución 1:10⁴ de FSA-PC) y a largo plazo (24 horas; dilución 1:100 de FSA-PC) no mostraron daños significativos con respecto a la respuesta de L-Serina Control, pero si hubo una disminución (no significativa) en los dos tipos de exposición a la FSA-PC. Estudios de Nakatani *et al*, 1991 demostró que la exposición por una hora a concentraciones subletales por sí sola no tuvo efectos en el éxito ni la velocidad del retorno en el proceso de migración. La exposición por 24 horas tampoco demostró tener un impacto significativo en la trucha y se piensa que puede ser porque en todos los estudios realizados la exposición es mucho mayor, desde 7 días hasta meses de exposición a altas concentraciones de la FSA-PC (Solangi & Overstreet, 1982). Las altas concentraciones a las que son expuestos los peces en el laboratorio, no necesariamente se observan en el ambiente marino, ya que es muy difícil predecir el real impacto de la exposición a la FSA-PC (Malins, 1982). Aunque no es posible simular todos los aspectos de un derrame en el agua, creemos que el olfato de los salmónidos no se vería afectado en el momento que ocurre un derrame de petróleo, sino que los efectos tanto en la disminución del olfato, como los efectos colaterales que puede llegar a tener en otros sistemas sería más a largo plazo. No se ha investigado experimentalmente la exposición de los salmónidos juveniles y su capacidad de regresar al hogar como adultos. Por lo tanto, sería muy especulativo predecir qué efecto tendría el agua contaminada con la capacidad de regresar como adulto a la etapa de reproducción (Nakatani & Nevessi, 1991). Con estos antecedentes, la exposición a petróleo a la que fueron expuestos los animales no afectó de manera significativa y hasta la fecha no se sabe con certeza si afectaría en la migración de estos animales.

En los cortes histológicos realizados se observó en la Figura 14 que la roseta expuesta a 24 horas de FSA-PC (1:100) un ligero engrosamiento del epitelio olfatorio. En el estudio de Solangi & Overstreet 1982, *Menidia herylina* fue expuesta por 7 días a una concentración de 100 mg/L de petróleo induce hiperplasia aguda, reduciendo la superficie sensorial expuesta al ambiente. Como en la Figura 12 se observa una disminución de la amplitud a la respuesta de L-Serina por el engrosamiento del tejido epitelial al perfundir la roseta por 24 horas. Este engrosamiento es considerado no significativo, ya que para hacer una real comparación debemos realizar el mismo

tratamiento para por lo menos 10 especies diferentes de peces para poder hacer una comparación real. Otra de las causas de por qué se ve más engrosado el epitelio en la Figura 14 C es que este corte está levemente posicionado de forma oblicua, lo que hace que visualmente se vea más grueso con respecto a los demás cortes.

CONCLUSIONES.

En este trabajo mostramos mediante la técnica de electroolfatograma (EOG) que la fracción soluble en agua del petróleo crudo actúa y es considerado un olor para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), ya que hubo respuesta a todas las diluciones de FSA-PC y al ser un animal migratorio, el olfato de este animal es muy sensible y evolutivamente utilizan su olfato para propósitos migratorios. La respuesta de L-Serina a 100 μ M fue en aumento al estimular con las diluciones de FSA-PC más concentradas, indicando la existencia de algún mecanismo de potenciación y/o recuperación. La exposición inmediata, de corto y largo plazo no afectó la detección de L-Serina y las disminuciones que se observaron en los resultados se puede deber a error estándar o a la variación de un grupo finito de datos del promedio de una población heterogénea, lo que nos indica que no daña de forma grave el epitelio olfatorio, como lo indican los cortes histológicos realizados. Además, se pudo determinar que la exposición por menos de 24 horas a la FSA-PC no varió significativamente, por tanto, no hubo una disminución, lo que nos podría indicar preliminarmente que este nivel de exposición no causa estragos en el sistema olfatorio, pero si en otros órganos y tejidos. El petróleo podría causar innumerables daños en diversos sistemas tales como respiratorios, inmune, nervioso, renal, digestivo, lo que a largo plazo podría gatillar comportamientos errados. Se necesitan más estudios para corroborar que realmente los derrames de petróleo no provocan daño en la migración de los peces y si estos derrames producen algún tipo de rechazo que dé lugar a un cambio de hábitat.

REFERENCIAS.

- Abud María José, Bofill María Jesús & Fernández Florencia. La industria del Salmón y el recurso natural agua (Seminario de título, 2009). Universidad de Chile, Chile.
- Ache BW & Young JM (2005) Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48:417–430 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269360> [Accessed March 26, 2012].
- Akaishi, F. M., De Assis, H. S., Jakobi, S. C. G., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, S. C., & Ribeiro, C. O. (2004). Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 46(2), 244-253.
- Altukhov, Y. P., Salmenkova, E. A., & Omelchenko, V. T. (2008). *Salmonid fishes: population biology, genetics and management*. John Wiley & Sons.
- Anderson, J. W., Neff, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., & Hightower, G. M. (1974). Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology*, 27(1), 75–88. <http://doi.org/10.1007/BF00394763>
- Arukwe A, Nordtug T, Kortner TM, Mortensen AS & Brakstad OG. 2008. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environmental Research* 107:362–370.
- Baxter, C. V., Fausch, K. D., Murakami, M., & Chapman, P. L. (2007). Invading rainbow trout usurp a terrestrial prey subsidy from native charr and reduce their growth and abundance. *Oecologia*, 153(2), 461–470. <http://doi.org/10.1007/s00442-007-0743-x>

- Bazáes A, Olivares J, Schmachtenberg O (2013) Properties, projections, and tuning of teleost olfactory receptor neurons. *J Chem Ecol* 39:451–464 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468224> [Accessed June 6, 2014].
- Blumer, M. (1971). Scientific aspects of the oil spill problem. *Envtl. Aff.* 1, 54.
- Bone Q & Moore R (2008) *Biology of Fishes* (Owen E, ed)., third edit. Saunders College Publishing. Pp 334-335.
- Bøhle, B. (1986). Avoidance of petroleum hydrocarbons by the cod (*Gadus morhua*).
- Carls MG. 1987. Effects of Dietary and Water-borne Oil Exposure on Larval Pacific Herring (*Clupea harengus pallasi*) *Marine Environmental Research* 22:253–270.
- Davis HK, Moffat CF, Shepherd NJ. 2002. Experimental Tainting of Marine Fish by Three Chemically Dispersed Petroleum Products, with Comparisons to the Braer Oil Spill. *Spill Science & Technology Bulletin* 7:257-278.)
- DeMaria, S., & Ngai, J. (2010). The cell biology of smell. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 443–452. <http://doi.org/10.1083/jcb.201008163>
- Dew WA, Azizishirazi AA & Pyle GG. 2014. Contaminant-specific targeting of olfactory sensory neuron classes: connecting neuron class impairment with behavioural deficits. *Chemosphere* 112:519-525.
- Durst, H. D., & Gokel, G. W. (1985). *Química orgánica experimental*. Reverté. Pp 75.
- Evans, R. E., & Hara, T. J. (1985). The characteristics of the electro-olfactogram (EOG): Its loss and recovery following olfactory nerve section in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brain Research*, 330(1), 65–75. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90008-3](http://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90008-3)
- Gonçalves R, Scholze M, Ferreira AM, Martins M, Correia AD. 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108:205–213.

- Hara TJ & Zhang C (1998) Topographic bulbar projections and dual neural pathways of the primary olfactory neurons in salmonid fishes. *Neuroscience* 82:301–313
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9483522>.
- Haensly, W. E., Neff, J. M., Sharp, J. R., Morris, A. C., Bedgood, M. F., & Boem, P. D. (1982). Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *Journal of Fish Diseases*, 5(5), 365-391.
- Hansen, A., & Zielinski, B. S. (2005). Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of neurocytology*, 34(3-5), 183-208.
- Heras, H., Ackman, R. G., & Macpherson, E. J. (1992). Tainting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by petroleum hydrocarbons during a short-term exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 24(6), 310-315.
- Jones, J. C., & Reynolds, J. D. (1997). Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(4), 463-491.
- Kleene, S. J. (2008). The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chemical Senses*, 33(9), 839–859.
<http://doi.org/10.1093/chemse/bjn048>
- Lari, E., Abtahi, B., Hashtroudi, M. S., Mohaddes, E., & Døving, K. B. (2015). The effect of sublethal concentrations of the water-soluble fraction of crude oil on the chemosensory function of Caspian roach, *Rutilus caspicus* (YAKOVLEV, 1870). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(8), 1826-1832
- Malins, D. C. (1982). Alterations in the cellular and subcellular structure of marine teleosts and invertebrates exposed to petroleum in the laboratory and field: a critical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(6), 877-889.

- Matthews, H. R., & Reisert, J. (2003). Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), 469–475. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00097-7](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00097-7)
- Maynard, D. J., & Weber, D. D. (1981). Avoidance reactions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to monocyclic aromatics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(7), 772–778.
- Nakatani, R. E., & Nevissi, A. E., (1991). Effect of Prudhoe Bay crude oil on the homing of coho salmon in marine waters. *North American Journal of Fisheries Management*, 11(2), 160–166.
- Neff JM, Cox BA, Dixit D. & Anderson JW. (1976). Accumulation and release of petroleum derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. *Mar Biol* 38: 279–89.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- Nelson B & Smith A. 1972. Oil pollution and marine ecology. Paul Clack Scientific Brok Ltd. London. 420 p.
- Nikonov AA, Caprio J (2007) Highly Specific Olfactory Receptor Neurons for Types of Amino Acids in the Channel Catfish. *J Neurophysiol*:1909–1918.
- Omorieg E & Ufodike BC. 2000. Effects of water soluble fractions of crude oil on growth of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:601–5.
- Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). Calcium-activated chloride channels do not contribute to the odorant transduction current in the marine teleost *Isacia conceptionis*. *Journal of Fish Biology*, 83(5), 1468–1473. <http://doi.org/10.1111/jfb.12253>

- Reisert, J., & Zhao, H. (2011). Perspectives on: Information and coding in mammalian sensory physiology: Response kinetics of olfactory receptor neurons and the implications in olfactory coding. *The Journal of General Physiology*, 138(3), 303–310. <http://doi.org/10.1085/jgp.201110645>
- Solangi, M. A., & Overstreet, R. M. (1982). Histopathological changes in two estuarine fishes, *Menidia beryllina* (Cope) and *Trinectes maculatus* (Bloch and Schneider), exposed to crude oil and its water-soluble fractions. *Journal of Fish Diseases*, 5(1), 13–35. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00453.x>
- Sorensen PW & Caprio J (1998) Chemoreception. In: Evens DH (ed) *The physiology of fishes*, CRC LLC, New York, pp 375-405
- Tesorio, L. D. T. (2013). Acute and Sublethal Toxicity Effects of Petroleum Hydrocarbon Exposure on the Survival, Growth and Behavior of Milkfish *Chanos chanos* Fry.
- Valdés Joaquín (2015). Evaluación de la potencia odorífera de componentes del sudor mediante electroolfatograma en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Unidad de Investigación). Universidad de Valparaíso, Chile.
- Valdés, J., Olivares, J., Ponce, D., & Schmachtenberg, O. (2015). Analysis of olfactory sensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals their ability to detect lactic acid, pyruvic acid and four B vitamins. *Fish physiology and biochemistry*, 41(4), 879-885.
- Xue, W., & Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and applied pharmacology*, 206(1), 73-93
- Zahl, I. H., Samuelsen, O., & Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: Implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 201–218. <http://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1>

Zhang, S., Cordon-Cardo, C., Zhang, H. S., Reuter, V. E., Adluri, S., Hamilton, W., ...& Livingston, P. O. (1997). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *International Journal of Cancer*, 73(1), 42-49

ANEXO.

Muestra de crudo C-403.

Esta muestra corresponde a la carga (Crudo) que alimenta la Planta de Topping N° 2, (Destilación Atmosférica).

El crudo que alimento a esta unidad, tal como ocurre en otras plantas similares correspondo a una mezcla de varios de los crudos que conforman la gama de una refinería en particular, los cuales se encuentran almacenados en estanques, esperando el momento en que sean considerados para ser parte de la preparación de la carga.

Petróleo, es el nombre genérico que se da a la sustancia compuesta por una mezcla de Hidrocarburos de color oscuro, que se encuentra en estado natural en algún estrato de la corteza terrestre. Dependiendo del lugar geográfico del Universo desde donde se extraiga esta sustancia, cada Petróleo (Crudo) tendrá sus propias características en cuanto a Densidad, contenido de azufre, metales etc. Su estructura y composición molecular determinará si se trata de un crudo parafínico, nafténico aromático, cada una de las características mencionadas, le confiere a cada crudo una potencialidad en cuanto a calidad, cantidad y especificaciones de los productos que de él se obtienen. Lo que en términos generales determina su precio. Por ejemplo Crudos más livianos, (mayor°API) con bajo contenido de azufre, son escasos y considerablemente más caros, Crudos más pesados con alto contenido de azufre, son más baratos, pero el costo de refinación es mayor, Las exigencias medioambientales exige incorporar en los procesos Plantas de tratamientos intermedias que aumentan los costos.

Por lo anterior es que las Refinerías poseen Departamentos de Programación de la Producción, en donde se planifica con antelación las mezclas de los distintos crudos que se dispone, para responder a la necesidad y requerimiento de los clientes en cuanto a calidad, cantidad y oportunidad. En este caso la muestra en cuestión, tomada el 15 de Noviembre de 2015, correspondió a una mezcla de 4 crudos y un pequeño % de Slop, que son productos fuera de especificación, que se almacenan en un estanque dedicado y que son reprocesados, incluyéndolos en pequeñas cantidades en las diferentes preparaciones que constituyen la carga de una planta.

Los crudos escogidos más una pequeña cantidad de Slop, fueron “preparados”, en el Estanque llamado T-3001, sometidos a agitación para homogeneizar la mezcla y reposo para decantación del agua antes de ser bombeada a la planta.

Tabla 1: Componentes de la mezcla de petróleo crudo que se usó en la investigación.

Carga Topping 2 Estanque T-3001 Crudos	Porcentaje (%)
LULA (Origen, Brasil)	62.5
ORIENTE (Medio Oriente)	20.4
NAPO (Origen Ecuador)	14.3
SAPINHOA (Origen Brasil)	1.5
SLOP (Reproceso, fuera de especificación)	1.3

Atte. Rubén Grandón Concha.-

Tabla 2: Promedio de registros (mínimo 3) de control positivo (L-Serina a 100 μ M) y control de vehículo (agua).

L-Serina Control.	Agua.
0.2399	0.0202
0.4237	0.0330
0.4071	0.0483
0.5634	0.0359
0.4471	0.0146
0.1104	0.0725
0.3809	0.0939
0.3074	0.1151
0.4793	0.7777
0.6226	0.0512
0.6451	0.1273
0.2882	0.0726
0.5663	0.0272
0.1861	0.0788
0.8644	0.0164
0.4625	0.0367

Tabla 3: Análisis estadístico de los registros controles (positivo y de vehículo).

Table Analyzed	Data 1
Column A	L-Serina Control
vs	vs
Column B	Agua (TW)
Unpaired t test	
P value	< 0,0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5,070 df=30
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0,4372 ± 0,04775 N=16
Mean ± SEM of column B	0,1013 ± 0,04591 N=16
Difference between means	0,3358 ± 0,06624
95% confidence interval	0,2005 to 0,4711
R squared	0,4614
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1,082, 15, 15
P value	0,8808
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabla 4: Promedio de registros (mínimo 3) de la amplitud de EOG en respuesta a las distintas diluciones de FSA-PC.

Control vehículo	1:10⁵	1:10⁴	1:10³	1:100	1:10
0.020200	0.158200	0.184000	0.171000	0.218700	0.437700
0.033000	0.362000	0.206900	0.334600	0.171400	0.314500
0.048300	0.072200	0.076000	0.102500	0.107200	0.246100
0.035900	0.083400	0.090600	0.142100	0.135200	0.231400
0.014600	0.257600	0.138500	0.322200	0.175800	0.375400
0.072500	0.307100	0.280300	0.195700	0.337700	0.502700
0.093900	0.611800	0.498000	0.619700	0.662200	0.893200
0.115100	0.587800	0.473100	0.377000	0.412900	1.884100
0.777700	0.966700	0.769300	0.772800	0.829300	1.285900
0.051200	0.748700	0.677700	0.620300	0.733900	1.186200
0.127300	0.753700	0.607100	0.615100	0.690200	1.288700
0.072600	1.349000	1.158200	1.377000	1.025000	1.117200
0.027200	1.413900	1.071500	1.002200	1.365500	1.828500
0.078800	1.048500	1.940100	1.624200	1.234100	2.110900
0.016400	0.492500	0.409700	1.173700	0.644900	2.295700
0.036700	0.334000	0.280900	0.233500	0.345500	0.595800

Tabla 5: Análisis estadístico del promedio de registros de la amplitud de EOG en respuesta a las diluciones de FSA-PC.

P value	P<0,0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	35,56		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0,05?	Summary
Control vehículo vs 1:10 ⁵	-39,75	Yes	***
Control vehículo vs 1:10 ⁴	-36,06	Yes	**
Control vehículo vs 1:10 ³	-40,25	Yes	***
Control vehículo vs 1:100	-39,81	Yes	***
Control vehículo vs 1:10	-55,63	Yes	***

Tabla 6: Promedio de registros (mínimo 3) de la amplitud de la respuesta a L-Serina después de las diluciones de FSA-PC.

L-Serina Control.	L-Serina (1:10⁵).	L-Serina (1:10⁴).	L-Serina (1:10³).	L-Serina (1:100).	L-Serina (1:10).
0.239900	0.226900	0.292200	0.268000	0.187900	0.302600
0.423700	0.539900	0.422800	0.669500	0.382800	0.462900
0.407100	0.595700	0.571500	0.465700	0.608400	0.734000
0.563400	0.379700	0.448500	0.385800	0.465400	0.333400
0.447100	0.684500	0.454700	0.646300	0.650900	0.541800
0.110400	0.209000	0.173100	0.217900	0.198900	0.208200
0.380900	0.465200	0.434800	0.361900	0.359000	0.489300
0.307400	0.335300	0.391400	0.362200	0.315200	0.168200
0.479300	0.504800	0.503000	0.468800	0.464600	0.349800
0.622600	0.666700	0.518300	0.804100	0.777400	0.867400
0.645100	0.497600	0.701800	0.631500	0.638500	0.661500
0.288200	0.382400	0.458100	0.501300	0.481900	0.576500
0.566300	0.524200	0.956700	0.790500	1.068000	1.597200
0.186100	0.076000	0.084700	0.178100	0.684100	0.230100
0.864400	1.357500	1.122700	1.438600	1.530300	1.753900
0.462500	0.689900	0.454000	0.653300	0.650900	0.553400
0.756600	0.845400	0.997000	0.912300	1.587800	1.567600
0.844600	0.968700	1.140600	0.875800	0.898900	1.119300
0.435000	0.728500	0.650800	0.906600	0.824900	1.010400
0.322000	0.238900	0.646300	0.547400	0.644400	0.600300
0.4676315	0.5458518	0.5711539	0.6042812	0.6710181	0.706390
0.2064684	0.2953683	0.289818	0.299159	0.3779345	0.4759002

Tabla 7: Análisis estadísticos de los registros de EOG en respuesta a L-Serina después de la estimulación con las diluciones de FSA-PC.

Table Analyzed	Data 1		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,3160		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	5,900		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0,05?	Summary
L-Serina Control vs L-Serina (1:10 ⁵)	-11,64	No	ns
L-Serina Control vs L-Serina (1:10 ⁴)	-13,02	No	ns
L-Serina Control vs L-Serina (1:10 ³)	-18,75	No	ns
L-Serina Control vs L-Serina (1:100)	-23,77	No	ns
L-Serina Control vs L-Serina (1:10)	-22,82	No	ns

Tabla 8: Promedio de registros (minimo 3) de la respuesta ante la perfusion con FSA-PC a distintas concentraciones y una perfusion de agua.

L-Serina control	L-Serina perfusión FSA-PC 1:10 ⁴	L-Serina perfusión agua	L-Serina perfusión 24 horas
0.844600	0.345000	0.177500	0.1600751
0.844700	0.062300	0.128700	0.4527855
0.288200	0.209900	0.216500	0.3364032
0.623200	0.252500	0.232300	0.4756378
0.312700	0.547900	0.486100	0.347971

Tabla 9: Análisis estadístico de los registro de EOG en respuesta a L-Serina después de las perfusiones realizadas (45 minutos de FSA-PC 1:10⁴; 45 minutos de agua (TW) y 24 horas de FSA-PC 1:100).

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0,4470		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	0,9071		
R squared	0,06851		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	2,046		
P value	0,5629		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,1097	3	0,03657
Residual (within columns)	1,492	37	0,04032
Total	1,602	40	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?
L-Serina control vs L-Serina perfusión FSA-PC 1:10 ⁴	0,1095	1,335	No
L-Serina control vs L-Serina perfusión agua	0,08411	1,026	No
L-Serina control vs L-Serina perfusión 24 horas	0,1484	1,389	No
L-Serina perfusión FSA-PC 1:10 ⁴ vs L-Serina perfusión agua	-0,02536	0,3094	No
L-Serina perfusión FSA-PC 1:10 ⁴ vs L-Serina perfusión 24 horas	0,03896	0,3645	No
L-Serina perfusión agua vs L-Serina perfusión 24 horas	0,06432	0,6018	No

Tabla 10: Estimulación con L-Serina en FSA-PC de menor a mayor concentración.

L-Serina control	L-Serina en 1:10 ⁵	L-Serina en 1:10 ⁴	L-Serina en 1:10 ³	L-Serina en 1:100	L-Serina en 1:10
0.06569569	0.1939855	0.2852299	0.1696343	0.1986823	1.561257
0.6509025	0.5056744	0.569241	0.3608283	0.3257363	1.542994
0.221874	0.838029	1.474630	0.709491	0.022183	1.401910
1.276280	0.957874	1.040010	0.872712	0.846033	0.997274
0.640495	0.856892	2.108760	0.845354	1.060360	1.642640
1.025110	0.728239	0.666729	0.635170	0.956754	0.987598
1.367000	1.300610	1.178880	1.095650	1.480520	1.355460

Tabla 11: Análisis estadístico de los registros de EOG en respuesta a L-Serina en las distintas diluciones de FSA-PC, de menor a mayor concentración.

P value	0,3227		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2,522	5	0,5043
Residual (within columns)	7,220	36	0,2006
Total	9,742	41	
Post test for linear trend			
Slope	0,03490		
R squared	0,06126		
P value	0,0931		
P value summary	ns		
Is linear trend significant (P < 0.05)?	No		

Tabla 12: Estimulación con L-Serina en FSA-PC de mayor a menor concentración.

L-Serina control.	L-Serina en 1:10.	L-Serina en 1:100.	L-Serina en 1:10 ³ .	L-Serina en 1:10 ⁴ .	L-Serina en 1:10 ⁵ .
0.3861249	2.235751	0.5392699	0.4047505	0.3030831	0.5140758
0.7412266	1.707189	0.5458931	0.6000407	1.598459	0.2885046
0.0999901	1.461550	0.111281	0.278857	0.615344	0.488147
1.200290	1.276740	1.168200	1.462400	1.318340	1.118060
0.282462	1.587870	0.356514	0.362504	0.824965	0.432817
0.217166	2.220880	0.601434	0.667021	1.264070	0.476321
0.863484	1.061190	0.746061	0.791751	0.754241	0.766481
0.991156	1.082140	0.993104	1.124270	0.962150	0.857264

Tabla 13: Análisis estadístico de los registros de EOG en respuesta a L-Serina en las distintas diluciones de FSA-PC, de mayor a menor concentración.

Number of groups	6		
F	7,705		
R squared	0,4784		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	2,142		
P value	0,8292		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	5,814	5	1,163
Residual (within columns)	6,338	42	0,1509
Total	12,15	47	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?
L-Serina control vs L-Serina en 1:10	-0,9814	5,053	Yes
L-Serina control vs L-Serina en 1:100	-0,03498	0,1801	No
L-Serina control vs L-Serina en 1:10 ³	-0,1137	0,5854	No
L-Serina control vs L-Serina en 1:10 ⁴	-0,3573	1,840	No
L-Serina control vs L-Serina en 1:10 ⁵	-0,01997	0,1028	No
L-Serina en 1:10 vs L-Serina en 1:100	0,9464	4,873	Yes
L-Serina en 1:10 vs L-Serina en 1:10 ³	0,8677	4,467	Yes
L-Serina en 1:10 vs L-Serina en 1:10 ⁴	0,6241	3,213	Yes
L-Serina en 1:10 vs L-Serina en 1:10 ⁵	0,9615	4,950	Yes
L-Serina en 1:100 vs L-Serina en 1:10 ³	-0,07873	0,4053	No
L-Serina en 1:100 vs L-Serina en 1:10 ⁴	-0,3224	1,660	No
L-Serina en 1:100 vs L-Serina en 1:10 ⁵	0,01501	0,07728	No
L-Serina en 1:10 ³ vs L-Serina en 1:10 ⁴	-0,2436	1,254	No
L-Serina en 1:10 ³ vs L-Serina en 1:10 ⁵	0,09374	0,4826	No
L-Serina en 1:10 ⁴ vs L-Serina en 1:10 ⁵	0,3374	1,737	No