

Aplicación de los campos de las memorias olfativas del canino por medio de la *colonización odorante* en la detección de feromonas de oviposición de *Ceratitis Capitata* Mosca de los frutos.

M.R. Rosillo

Programa Incan Trehua (Perros Protectores / L.Mapuche)

FUNBAPA. Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica

SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

Resumen

La capacidad olfatoria y el poder de discriminación en el canino se debe a varios factores, entre ellos: la capacidad cuantitativa neuronal olfatoria; la estructura bulbar; mapeo cortical olfatorio; y el extraordinario enlace asociativo, lo que posibilita los registros sensoriales y engramas de memoria. Los registros sensoriales captan los estímulos y los codifican dando una imagen mental del olor.

Los registros sensoriales sirven para que la información esté presente el tiempo suficiente a fin de ser detectada y seleccionada para luego pasar a memoria olfativa de largo plazo (MOLP). El estudio comprende 3 etapas de procesamiento de los campos de las memorias olfativas del perro. También se ha trabajado con el principio de simultaneidad entre el condicionamiento asociativo y el estímulo provocador que es la palabra “busque” asociada al olor feromonal de la Mosca de los Frutos en el sector de la ovoposición, conjuntamente con estratos sintomáticos del fruto, lo que permite integrar por medio de la *colonización odorante* a la memoria olfativa del canino una mayor capacidad en la discriminación e identificación de frutas larvadas o con síntomas de ovoposición. Se utilizaron Caninos de la Raza Beagle, con edades entre 8 a 9 meses. Para ello evaluamos la retención de las memorias olfativas dentro del rango a largo plazo. Paralelamente al presente se trabajó se formaron Caninos Detectores de Frutas y Subproductos de Origen Animal, para su aplicación en las Barreras Zoofitosanitarias de la Patagonia Argentina. El principal objetivo del Sistema Cuarentenario Patagónico es evitar el ingreso a la Región Protegida de plagas o enfermedades que puedan afectar a la producción regional. Lograr el pleno reconocimiento internacional, además de sostener lo logros ya obtenidos, requiere siempre sumar nuevos esfuerzos que optimicen, haciéndolos más dinámicos, económicos y aceptables, a los ya existentes.

Palabras claves: *Ceratitis Capitata*, Epitelio olfativo, neuronas olfativas, *colonización odorante* (*) registros sensoriales, engramas de memoria, improntas asociativas, memoria de largo plazo, *colonización odorante*, detección y discriminación olfatoria.

Introducción

Potenciar el funcionamiento de las Barreras Sanitarias del País, ha llevado a la conformación del Programa *Incan Trehua* (Perros Protectores/L.Mapuche) por parte de FUNBAPA (*Fundación Barrera Zoofitosanitaria de la Patagonia*) consistente en el adiestramiento de caninos detectores de productos y subproductos de origen vegetal y animal, cuyo ingreso a las áreas de Producción Protegida se encuentra restringida. Al utilizar el olfato de los perros para detectar productos de origen vegetal o animal, se logra una mayor eficiencia en los puestos, a la vez que se facilita el trabajo de los inspectores. Como parte del Programa *Incan Trehua* se desarrolló y dentro de un marco de tipo experimental, el adiestramiento de caninos de raza “Beagle”, para la detección de fruta infectada con larva de *Ceratitis Capitata*, posibilitando así demostrar el gran poder discriminatorio que posee el olfato canino, y contar con esta herramienta para su aplicación al Sistema Cuarentenario Patagónico. Las **feromonas** son compuestos utilizados para la comunicación entre miembros de una misma especie.

El componente feromonal más volátil identificado es el *acetato de etilo*, quees un constituyente de la feromona sexual de la mosca de fruta, *Ceratitis Capitata* (Jang, 1994).

Su punto de fusión de 77 °C y la presión de vapor 76 Torrìcelli a t.a. indican que la substancia evapora fácilmente. Si su reservorio (*glándula o superficie*) queda expuesto, lamayoría de las moléculas se van a evaporar inmediatamente, produciendo una señal corta de alta intensidad. (Hermitte Grabiela. 2012).Una vez que la hembra localiza un fruto en condiciones favorables para el desarrollo de su progenie, procede con la ovoposición introduciendo los huevecillos con el ovopositor al interior del fruto hospedante en grupos hasta de 8 a 12 huevecillos (*Ceratitis capitata* Wiedemann) por cada postura. Concluida esta operación la hembra arrastra el ovopositor (*parte terminal del abdomen*) alrededor del sitio de postura para impregnarlo de una sustancia denominada “*feromona de marcaje de ovoposición*”, a través de la cual evitará que otras moscas de la fruta depositen sus huevecillos en el mismo fruto.

MATERIALES Y METODOS

- 1.1 Cuatro Caninos de la Raza Beagle: con la edad de 8 y 9 meses, pertenecientes al plantel de Programa *Incan Trehua (FUNBAPA) Dartagnan; Laurita; Drinker; Chiquita*
- 1.2 *Gasas esterilizadas con material de colonización: Larvas Ceratitis Capitata maceradas; síntoma de cascara del fruto (cítricos); Trimedlure / (Pheromonebaitpolimerdispenser)*
- 1.3 Reforzadores alimenticios
- 1.4 Técnica de marcación pasiva
- 1.5 Estimulación de los campos de memoria olfativa del canino, por medio de la técnica *Colonización Odorante(*)*
- 1.6 Técnicas de obediencia básica simple
- 1.7 Entrenamiento por refuerzo positivo con base alimenticia
- 1.8 Técnicas de exploración dinámica en paquetes, bolsos, valijas
- 1.9 Técnicas de exploración dinámica en vehículos (*automóviles, bus, camiones, ferrocarriles*)
- 1.10 Técnicas de exploración dinámica sobre cinta transportadora de aeropuertos

La metodología usada se basa en estimular los campos de memoria olfativa del canino, y a la vez desarrollar una *colonización odorante* de cada producto. Esto se desarrolla con la utilización de diferentes improntas cada una realizada en su etapa correspondiente y con un orden predeterminado. A esta técnica de improntas corresponde el presente estudio indicativo experimental sobre la repercusión odorífera de una sustancia determinada sobre los receptores olfativos, a manera de *colonización odorante*, con intervención de los *campos de las memorias olfativas*. (Rosillo M.R. 2004 /Incan Trehua.)Esto permite determinar una mayor capacidad de detección en la identificación de sustancias, con mayor precisión desarrollada en un periodo de capacitación de 6 semanas.

Umbrales Olfatorios

Umbral de detección. Este se mide por la mínima concentración capaz de producir una percepción olfatoria. Cuando este umbral es alcanzado se reconoce la presencia del olor, si bien de modo inespecífico sin poder identificar con precisión donde se encuentra la sustancia.

Umbral de reconocimiento específico o identificación: Se mide por la concentración mínima que permite identificar el olor con precisión.- (Affani, J.M.-1992).- Produciendo en el canino cambios comportamentales que se traducen como *evocaciones de memoria*- Hay presencia de “**alerta**” (*rascado – mordida – posición corporal pasiva – vocalización –miradas – lengua – pilo erección movimientos de cola*)

Colonización (Etimología) *Formar o establecer colonia en un lugar. Fijar en un terreno la morada de sus cultivadores- Diccionario Enciclopédico Océano*

La *colonización odorante* es la disposición para lograr que un odorante se aplique a la superficie del epitelio olfatorio por una puerta de ingreso que son las narinas del perro, en tiempo y forma establecidos en el *Protocolo de Colonización Odorante*, con el objeto de establecer una colonia odorante, tratando de acentuar un contacto fluido con los receptores olfatorios, promoviendo sus

vidas y su viabilidad, teniendo en cuenta la magnitud de grupos odorantes competentes en el canino, llevando este mensaje a las células progenitoras para la transmisión genética de códigos olfatorios. (Rosillo, M.R. 2007/Odorología Forense/)

Las neuronas olfatorias son funcionalmente distintas, ya que cada una de ellas, expresa un único receptor olfativo. Es la combinación exclusiva de receptores olfativos activados lo que permite distinguir las sustancias olorosas entre sí. (Buck LB. 1995; Axel R. 1995).

Una vez que los receptores olfativos son activados y como cada neurona expresa solamente un tipo de receptor, los axones correspondientes a cada patrón de estimulación olfatoria envían la señal al cerebro. (Buck LB. 1996).

La vida media de una neurona olfatoria es de 30 a 90 días según las especies y se renuevan continuamente. La activación de los receptores depende también de pseudo genes que se encuentran en el epitelio olfatorio, como el caso del ser humano. Estos indicativos son muy bajos en el canino (Firestein S, Picco C, Menini A. 1993.) Si tapamos la nariz del perro en ausencia de un estímulo hace que las neuronas olfativas no tengan cometido, por lo tanto sobreviven en el epitelio tanto las células con el gen intacto, como las células con el gen alterado.

Pero cuando el perro está sometido a todo tipo de estímulos olfativos y se requiere la funcionalidad de las neuronas, solo las que son portadoras del cromosoma con el gen activo permanecen y colonizan todo el epitelio nasal. (Buck.LB.1996)

Esto sugiere que las sustancias olfativas y la actividad que evocan son críticas para la supervivencia de la neurona en un ambiente competitivo y también que esa actividad es necesaria en el mantenimiento y la organización del sistema olfativo. (Buck.LB. 1996)

El hecho de que las neuronas olfativas estén sometidas a una rápida renovación, garantiza su funcionalidad a pesar de las agresiones físicas o químicas a las que están sometidas. (Buck, LB. Cell 65(1): 175-87, April 1991). Esta renovación obliga a que los nuevos axones reconozcan los haces en los que han de converger, para así atravesar la lámina cribosa del cráneo (*etmoides*) hasta alcanzar su glomérulo en el bulbo olfatorio. (BUCK, L. – Cell 65(1): 175-87, April 1991). La codificación cuantitativa que permite evaluar la intensidad del olor, está en función del número de receptores estimulados y de la frecuencia de emisiones de los potenciales inducidos a la mucosa.-

El aumento en la concentración del *estímulo*, induce un aumento en el número de receptores activados.

Fenómeno de persistencia El órgano olfativo percibe a cada instante cantidades mínimas de olores dentro del umbral de detección o percepción, bajo este umbral acaban sumándose hasta rebasar el umbral de excitación o identificación. La intensidad percibida aumenta así con el número de inhalaciones mediante un fenómeno de *suma o potencialización*.

Etapa 1

Del día 1 al 3 se realizaron un total de 30 colonizaciones, mediante la adaptación a las gasas para su impregnación odorífera, haciendo reforzamiento variable, a los efectos de inducir la memoria olfativa de largo plazo (MOLP).

Etapa 2

Del día 4 al 7 se trabajaron los caninos en línea de exploración de búsqueda sobre 6 cajas en las cuales una contenía cítricos con síntomas de infestación por *Ceratitís Capitata* las demás elementos orgánicos distractores. Se incluyeron algunos ejercicios con montículos de arena y piedra con el fin de adaptar a espacios naturales. Haciendo un total de 60 colonizaciones.

Los días 8 y 9 se llevaron a cabo ejercicios de exposición superficial de cítricos infestados con *Ceratitís Capitata* campo abierto. Haciendo un total de 30 colonizaciones

El día 10 se realizaron ejercicios a campo abierto con restos de cascara y fruta cítrica con síntomas enterrada a 10 cm bajo tierra. Haciendo un total de 15 colonizaciones.

El día 11 se llevaron a cabo ejercicios con 8 valijas de diferente tamaño, donde uno contenía frutos cítricos infestados, los restantes sedimentos naturales y otros frutos (*manzana, pera, pimiento*), con el fin de poner a prueba a los caninos frente a olores distractores durante la secuencia de búsqueda. Haciendo un total de 30 colonizaciones.

La rutina de exploración se mantiene hasta el día 15. Se coloniza diariamente en un promedio entre 10 a 15 minutos por día.

El día 16 se realiza secuencias exploratorias en diferente tipo de vehículos, solo con fruta infestada. Haciendo un total de 15 colonizaciones.

Previa a la exploración de vehículos se realizaron juegos en los mismos, con la misma fruta (cítricos).

Etapa 3

Día 17 se repite las secuencias, cambiando de tipo de vehículos. Haciendo un total de 15 colonizaciones.

Hasta el día 22 se mantienen las rutinas. Se incluyen las rutinas sobre cinta transportadora en aeropuerto.

Tipo de vehículos utilizados: automóviles, camionetas, bus, camiones.

El día 25 se comienza las secuencias exploratorias con valijas y cajas cargadas con diversos elementos e incluyendo en algunas de ellas frutos cítricos sin infección.

Los caninos no mostraron situación de alerta sobre posibles síntomas o frutas infestadas. Haciendo un total de 15 colonizaciones.

El día 26 se realiza secuencias de exploración con valijas y cajas cargadas con diversos elementos distractores, cítricos infestados y cítricos no infestados.

Los caninos realizaron las marcaciones sobre la valija que contenía frutos infestados.

Estas secuencias se desarrollaron hasta el día 30, con variables de “falsos positivos” en escala de disminución. .

Sobre un total de 720 exploraciones en general (*Cajas, cajones, valijas, cinta, vehículos varios*) se registraron sólo 20 “falsos positivos”, escala que fue disminuyendo en la medida que la *colonización odorante* se establecía.

Cajones	Valijas	Bolsos	Cantidad de Exploraciones 400	Falsos Positivos 8
Vehículos medianos	Vehículos alta porte	Bus	Cantidad de Exploraciones 200	Falsos Positivos 7
Cinta transportadora. Aeropuerto	Carritos porta equipajes	Bultos generales	Cantidad de Exploraciones 120	Falsos Positivos 5

CERTIFICACIONES

Las evaluaciones fueron realizadas por un Jurado compuesto por las siguientes instituciones: FCA. Federación Cinológica Argentina; FV /UBA. Facultad de Veterinaria -Universidad de Buenos Aires; SENASA. Servicio nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria; ISCAMEN. Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria de Mendoza; FUNBAPA. Fundación Barreras Zoofitosanitarias de la Patagonia. Las evaluaciones en la que fueron certificados los caninos se basó en las siguientes exploraciones: *Valijas, cajas, cajones con fruta sana y una fruta infestada mezclada, cajones con fruta sana, vehículos medianos, bus, cinta transportadora.*

Las muestras fueron preparadas por el jurado sin la presencia de los conductores caninos.

En las alertas caninas sobre fruta infestada, se expone las frutas a la vista, donde el canino olfatea cada fruta hasta llegar a la fruta infestada (*no reconocible a simple vista*), el canino la toca con el hocico y se sienta, marcación pasiva indicativa de positivo. Luego se verifica la infección de la fruta. Las evaluaciones sobre cinta transportadora se realizaron con cinta en movimiento incorporando valijas, cajas, y mochilas, en un total de 20 bultos, en dos pasajes. Marcación positiva / sentado junto al bulto. Las evaluaciones en bus, se llevaron a cabo dentro de las bauleras con 20 bultos entre cajas y valijas. Marcación positiva/sentado junto al bulto.

CONCLUSIONES

La metodología utilizada se basó en estimular los campos de la memoria olfativa del canino, aplicando la técnica de la *colonización odorante*, en tiempo y forma acorde al protocolo de la misma. Esto se desarrolla con la utilización de diferentes improntas cada una realizada en su etapa correspondiente y con un orden predeterminado. Los componentes de las improntas van desde la maceración de larva de *Ceratitis Capitata* hasta el síntoma de fruta infestada. Estas improntas son la base de la formación de la memoria olfativa a largo plazo (MOLP), lo que permite la discriminación sobre frutas no infestada captando directamente la sustancia a grabar. El olor del medio ambiente refuerza la vida de las neuronas olfativas, el canino tiene alta competencia en el medio. Es por ello que el olor referenciado de una sustancia en la *colonización odorante* va a reforzar las neuronas sensoriales olfativas que codifican para ese odorante. La colonización odorante posibilita una mayor capacidad de detección en la identificación de sustancias, con mayor precisión, priorizando el *umbral de identificación específica odorante* por sobre el *umbral de reconocimiento odorante*, cuya aplicación también puede ser insertada en Caninos Detectores de Narcóticos, Explosivos, Papel Moneda, Cadáver, DVD, y otras.

(*) *Colonización Odorante*: terminología propuesta por el autor.

BIBLIOGRAFIA

Affani, J.M. and García Samartino, L.: comparative study of electrophysiological phenomena in the olfactory bulb of some South American marsupials and edentates. In Bolis, L.; Keynes, R.D. and Maddrel, S. H. P. (eds) Comparative Physiology Systems. Cambridge University Press, Cambridge, 1984, pp. 315-332.

Affani, J.M.; Gori, A.M.; Scaravilli, A.M. y García Samartino, L.: Aumento bilateral de la duración de respuestas olfatorias por sección de un péndulo olfatorio en *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae) *Physis*, 33:151-155, 1974.

Ben-Arie, N.; North, M.; Khen, M.; Gross-Isseroff.; Walker, N.; Horn-Saban, S.; Gat, U.; Natochin, M.; Lehrach, H.M; Lancet, D.: Olfactory reception: from signal modulation to human genome mapping-Olfaction and taste 1994; 9:122-126.

Bernier, U.R. Kline, D.L., Barnard, D.R., Schreck, C.E., and Yost, R.A. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry, Part 2: Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*), *Analytical Chemistry* (2000) 72 (4): 747-756

Buck, L. The olfactory multigene family, *current opinion in genetics & development* 2 (3) 467-73. June 1992.

Buck, L. Axel, R. Novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1):175-87. April 1991.

Buck, L.; Bigelow, J.; Axel, R.: alternative splicing in individual *Aplysia* neurons generates neuropeptide diversity. *Cell* 51(1): 127-33. October 1987.

Curran, A.M., Rabbin, S.I., & Furton, K.G. (2005). Analysis of the uniqueness and persistence of human scent. *Forensic Science Communication*, Vol 7 (2).

Harvey, L. and Harvey, J. Reliability of bloodhound in criminal investigations, *Journal of Forensic Sciences* (2003) 48 (4): 811-816.

Hermitte Gabriela. *Biologia Sensorial Animal* - 2012

Henderson, R. W. and Lightsey, G.W. Effective flame temperatures of flammable liquids, *Fire and Arson Investigator* (1984) 35 (12): 8

Houssay, A.B; Epper, C.E. and Pazo, J.h. neurohormonal regulation of the hair cycles in rest and mice. In Lyne, A.G. And Short, B.F. (eds): *In the Biology of the Skin and Hair Growth*. Augus And Robertson, Sidney, 1985.

Izquierdo, I.: Different forms of posttraining memory processing. *Behav. Neural Biol.* 51. 1988.

Izquierdo, I. : Endogenous state dependency: memory depends on the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing In: Lynch, G.; McGaugh, J.L. and Weinberger, N.M. (eds) *neurobiology of learning and memory*, pp. 65-77, Guilford Press, N. York, 1984.

Mishkin, M., Mamalut, B. And Bachevalier, J.: Memories and habits: two neural system. In: Lynch, G., McGaugh, J.L. and Weinberger, N.M. (eds), *Neurobiology of Learning and Memory*, pp. 65-77. Guilford Press, N. York, 1984.

Nicolaides, N. (1974) . Skin lipids: Their biochemical uniqueness. *Science*, 186(4158), 19-26.

Pazo, J.H. and Houssay, A.B: Effects of olfactory bulb resection upon the hair waves in mice. *J. Invest. Dermatol.* 54: 424-426, 1970.

Rosillo, M.R: Campos de las Memorias Olfativas del Canino. Programa INCAN_ TREHUA *Perros Protectores*- FUNBAPA- SENASA. Río Negro, Argentina.

Rosillo, M.R: Manual de Instrucción Levantadores de Huellas / Odorología Forense, Policía de Río Negro, Argentina. 2005

Rosillo, M.R.: Revista Policía Nacional de Colombia/Prospectiva Criminalística. Ed.Nº7- 2008

Rosillo, M.R.: Revista ECSAN. Colombia. 2007. Magazine academic-scientific communication channel with international projection.

Rutty, G.NH. An investigation into the transference and survivability of human DNA following simulated nabal strangulation with consideration of the problem of third party contamination, *Internacional Journal of Legal Medicine* (2000) 116 (3): 170-173.

Schoon, G.A.A. & De bruin, J.C. 1994.The ability of dogs to recognize and cross-match human odours. *Forensic Science International* 69: 111-118.

Schoon, G.A.A. 1996. Scent identification line-ups by dogs (*Canis familiaris*): experimental design and forensic application. *Applied Animal Behaviour Science* 49:257-267.