

**FACILITACIÓN DE LA CONDUCTA
SEXUAL MASCULINA EN RATAS HEMBRAS
POR KINDLING EN EL ÁREA PREÓPTICA MEDIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A :

BIOL. EXP. EMILIO DOMÍNGUEZ SALAZAR

T U T O R :

Dr. RAÚL G. PAREDES GUERRERO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Maestro José Luis Sánchez Acenjo por mostrarme el camino hacia la investigación y al Dr. Javier Velázquez Moctezuma, mi maestro y amigo, por permitirme dar mis primeros pasos en su compañía y por mostrarme lo maravilloso que podía ser recorrerlo.

Al Dr. Raúl Paredes Guerrero, mi tutor, por sus críticas y observaciones y, sobretodo, por permitirme divagar con los resultados y por siempre estar presente en el momento en que me asaltaba una duda o una idea.

A mis asesores, la Dra. Socorro Retana Márquez y la Dra. Luisa Rocha por sus comentarios y críticas que redundaron en el mejoramiento de este trabajo. A mis amigos Herlinda Bonilla, Gonzalo Vázquez y Armando Ferreira por sus comentarios y correcciones.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Arturo, por su buen humor, a Francisco porque siempre realizó su trabajo eficientemente y las pruebas conductuales se pudieron realizar, especialmente a Wendy Portillo que participó directamente en la realización del primer experimento.

Deseo también manifestar mi agradecimiento al Comité Académico de la Maestría en Biología Experimental, especialmente a la Dra. Concepción Gutiérrez, Coordinadora de la Maestría, por su apoyo a todo lo largo de mis estudios.

Finalmente agradezco a mis amigos del Circulo de Ciencias: Alberto, Alvaro, Carmen, Daniel, Diana, Edgar, Edith, Efrén, Esteban, Fer, Gina, Gonzalo, Karla, Linda, Lulú, Marco, Mayela, Oscar, Paco, Silverio, Sofia, Tere, Victor; por su apoyo y por compañía siempre fructífera y divertida.

CRÉDITOS

Este trabajo fue realizado en su mayor parte en el laboratorio del Dr. Raúl Paredes Guerrero, en Centro de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla.

Los primeros resultados se obtuvieron en el laboratorio del Dr. Javier Velázquez Moctezuma, en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La inmunohistoquímica contra Fos fue realizada en el laboratorio del Dr. Michel Baum, en la Universidad de Boston.

Las pruebas conductuales y la inmunohistoquímica contra Fos fueron realizadas con la participación de la Bióloga Wendy Portillo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis y al mismo tiempo expresar mi más grande agradecimiento a los amigos más sinceros que tengo, que siempre han estado cuando los he necesitado y que de no ser por ellos éste trabajo no habría sido siquiera empezado. Son dos personas que han marcado mi vida con su ejemplo de tenacidad y dedicación. Gracias por todo, papás.

También quiero dedicar este trabajo a mi hermano porque siempre he tenido su apoyo, su confianza y su amor. A su esposa Susana y a mi sobrino Omar Alejandro.

A mis abuelos, Esther y Mauricio, porque quisiera que su ejemplo también se heredara.

A mi tía Ma. Esther y a mis primos Hugo, Bety y Karla, simplemente porque los quiero.

Finalmente, pero no en último lugar, esta tesis quiero dedicarla a Lupe, porque la amo. Se la dedico porque quien siempre ha creído en mi, me ha permitido y ayudado a alcanzar mis metas y porque siempre está a mi lado cuando la necesito. Porque me apoyó y me ayudó a realizar este trabajo. Pero sobretodo porque me ha dado la razón más importante para vivir, un hijo: Fernando Emilio. Gracias.

A mi hijo y por mi hijo, porque la realidad supera a la imaginación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO 1. CONDUCTA SEXUAL	4
1.1 Descripción de la conducta sexual	4
1.2 Diferenciación Sexual y Conducta homotípica y heterotípica	6
1.3 Sistema de proyección vomeronasal	7
1.3.1 Órgano vomeronasal	9
1.3.2 Bulbo olfatorio accesorio	9
1.3.3 Amígdala medial	11
1.3.4 Núcleo de la cama de la estría terminal	12
1.3.5 Área preóptica media	12
1.4 Evaluación del funcionamiento del circuito de proyección vomeronasal	16
CAPITULO 2. ENCENDIMIENTO ELÉCTRICO (KINDLING)	19
2.1 Definición y descripción del kindling	19
2.2 Características electrofisiológicas para inducir kindling	20
2.3 Características conductuales del kindling	22
2.4 Propiedades Básicas del Kindling	23
2.5 Mecanismos del kindling	24
2.6 Efectos del kindling sobre la conducta sexual	27
2.7 Efectos del kindling sobre otras conductas	28
CAPITULO 3. TRABAJO EXPERIMENTAL	29
3.1 Planteamiento del problema	29
3.2 Metodología General	30
3.2.1 Sujetos.....	30
3.2.2 Implantación de electrodos.....	30
3.2.3 Inducción del kindling.....	30

3.3 Experimento 1: Efecto del kindling en el APM y la AMG sobre la Conducta Sexual	31
3.3.1 Objetivo.....	31
3.3.2 Tratamiento hormonal.....	31
3.3.3 Pruebas conductuales.....	31
3.3.4 Resultados de la evolución del kindling en el APM y la AMG.....	32
3.3.5 Resultados de las pruebas de conducta sexual	35
3.3.6 Discusión	39
3.4 Experimento 2: Registro múltiple durante	
la inducción del kindling en el APM o en la AMG	44
3.4.1 Objetivos.....	44
3.4.2 Implantación y registro.....	44
3.4.3 Resultados	44
3.4.4 Discusión	46
3.5 Experimento 3 : Evaluación del funcionamiento del sistema de	
proyección vomeronasal en los animales estimulados.....	51
3.5.1 Objetivo.....	51
3.5.2 Tratamiento.....	51
3.5.3 Exposición a claves sexualmente relevantes y perfusión.....	51
3.5.4 Conteo de neuronas marcadas con anti-Fos.....	51
3.5.5 Resultados	52
3.5.6 Discusión	53
CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL	58
4.1 Discusión general	58
4.2 Conclusiones	62
4.3 Perspectivas	64
APENDICE 1 : Preparación de Reactivos	65
APENDICE 2 : Inmunocitoquímica contra Fos	67
REFERENCIAS	68

RESUMEN

Trabajos previos han demostrado que el encendido eléctrico (kindling) aplicado en el área preóptica media (APM) es capaz de inducir conducta sexual masculina en ratas macho no copuladoras. Por tal motivo se decidió indagar si el kindling en el APM era capaz de provocar un aumento en la conducta sexual masculina (conducta heterotípica) en ratas hembras ovariectomizadas y tratadas con propionato de testosterona (PT).

Los resultados mostraron que la estimulación eléctrica del APM fue capaz de facilitar la conducta heterotípica al disminuir la latencia de monta y aumentar el número de estas con un tratamiento con una dosis baja (2.5 mg/Kg) de PT en comparación a sujetos falso estimulados (SHAM) y estimulados en la amígdala (AMG). Estos resultados se intentaron correlacionar con una mayor activación del circuito de proyección vomeronasal al olor de hembra en estro. Sin embargo, el número de neuronas inmunorreactivas a Fos en ninguna de las áreas pertenecientes al circuito, mostró diferencias entre los animales con kindling y los controles (SHAM) al ser tratados con PT durante 5 días.

Debido a que la facilitación de la conducta heterotípica se presentó sobre todo en los sujetos estimulados en APM y no en los sujetos estimulados en la AMG se decidió tratar de detectar diferencias poligráficas entre los sujetos estimulados en el APM y la AMG realizando un registro simultáneo del APM, la AMG, el núcleo de la cama de la estría terminal (NCET) y el tegmento dorsolateral (TDL) durante y después del estímulo eléctrico. El número de espigas durante los eventos paroxísticos no fue el mismo en cada área cerebral registrada, aunque si existió una alta correlación entre ellas. Además el número de eventos paroxísticos también fue diferente entre los sujetos estimulados en el APM y la AMG. Estos resultados nos permitieron concluir que se trataban de dos sistemas diferentes y probablemente tienen vías de propagación del estímulo eléctrico independientes, lo que explicaría de manera parcial las diferencias conductuales observadas.

Los resultados apoyan la idea de que el APM es un centro de regulación tanto de los aspectos motivacionales como de los ejecutorios, ya que la inducción de postdescargas en ese sitio es capaz de facilitar los aspectos motivacionales, mientras que la generalización del kindling tiene efectos sobre los aspectos ejecutorios.

INTRODUCCION

La conducta sexual es una de las expresiones conductuales más importantes para cualquier especie. Esta conducta representa la interacción de procesos neuroendócrinos, fisiológicos y anatómicos que se desarrollan desde estadios perinatales

La expresión del comportamiento sexual en los mamíferos depende de la interacción de al menos dos mecanismos: un mecanismo motivacional que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja y un mecanismo consumatorio o de ejecución que le permite llevar a cabo eficientemente dicha interacción (Beach, 1976).

En la actualidad existe bastante información acerca de la regulación de los aspectos motivacionales y ejecutorios de la conducta sexual. En este trabajo se hace énfasis en la información relacionada con la expresión de estos aspectos y sobre el sistema que parece regularlos: el circuito de proyección vomeronasal.

Estudios anatómicos previos realizados por varios investigadores han demostrado que este circuito de proyección vomeronasal es sexualmente dimórfico en la rata (Segovia y Guillamón, 1993 y 1996). Otros trabajos en los que se ha utilizado la expresión del gen inmediato temprano *c-fos* como un marcador inmunohistológico de actividad neuronal, han demostrado la activación del sistema a claves sexualmente relevantes. Por lo anterior, la respuesta de *c-fos* a claves sexualmente relevantes en el sistema de proyección vomeronasal es un marcador útil en la evaluación de los aspectos motivacionales de la conducta sexual. (Wersinger, 1993 ; Oboh y cols., 1995)

Por otro lado, el fenómeno del kindling, en el que las estimulaciones intracraneales de baja intensidad, repetidas y localizadas, llevan al desarrollo de postdescargas (PD's) focales, automatismos conductuales y, eventualmente a convulsiones motoras generalizadas (Goddard y cols., 1967, 1969). Esta alteración gradual en la función y expresión cerebral, es permanente, por estas características el kindling es considerado como un modelo de epilepsia, plasticidad neuronal y memoria.

La activación neural excesiva, como los eventos paroxísticos y epileptiformes generados por el kindling, pueden producir un gran número de efectos, y cualquiera de ellos podría llevar al desarrollo de un estado epileptogénico. Racine y su grupo (Racine y cols.,

1998) han agrupado esos efectos en tres grandes categorías : 1) Los que reflejan un aumento de la conectividad dentro de sistemas excitatorios, 2) los que reflejan una disminución (o aumento) del nivel de funcionamiento dentro de sistemas excitatorios, y 3) los que reflejan un cambio en las propiedades intrínsecas de la respuesta neuronal, es decir que se vuelven más susceptibles a disparar incontrolablemente.

Cuando el kindling es producido en el APM produce la aparición de la conducta sexual masculina en los animales no copuladores, no así en los animales sometidos a kindling en la amígdala (AMG) y los de kindling falso (SHAM), por lo que los cambios locales en el APM y no la propagación de la actividad neuronal producida por el kindling inducen conducta sexual masculina. Estos resultados demuestran la importancia del APM para la expresión de dicha conducta y sugieren que en los machos no copuladores la conducta sexual masculina no se manifiesta debido a que el APM se encuentra inhibida y el kindling es capaz de reactivarla. En el presente estudio se estableció el kindling en el APM en ratas hembras ovariectomizadas para tratar de inducir conducta sexual masculina. Se determinaron las diferencias electroencefalográficas existentes entre el kindling en el APM y el establecido en la AMG y se evaluó la respuesta del sistema de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes.

CAPÍTULO I. CONDUCTA SEXUAL

1.1 Descripción de la Conducta Sexual.

La expresión del comportamiento sexual en los mamíferos depende de la interacción de al menos dos mecanismos: un mecanismo motivacional que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja (Fig. 1A) y un mecanismo consumatorio o de ejecución que le permite llevar a cabo dicha interacción (Fig. 1B, 1C y 1D) (Beach, 1976).

La mayoría de los estudios en este campo se enfocan básicamente sobre los aspectos relacionados con la expresión de la conducta copulatoria en los roedores, es decir en el estudio de los patrones, fácilmente identificables. El patrón copulatorio de la rata macho es innato y esta compuesto de secuencias de actividad estereotipada. Este patrón consta de montas e intromisiones repetidas que culminan con la eyaculación (Sachs y Meisel, 1988). En la monta, el macho abraza con sus miembros anteriores los flancos de la hembra y presenta movimientos pélvicos de empuje, finalizando cuando el macho la desmonta lentamente (Fig. 1B). La intromisión es una monta con movimientos pélvicos más prolongados y profundos, luego del cual el macho desmonta a la hembra, rápida y bruscamente. En la mayoría de las investigaciones sobre conducta copulatoria se presupone que el patrón de intromisión va acompañado de penetración vaginal. La eyaculación es una intromisión que termina con un movimiento pélvico profundo e intenso, mantenido por algunos segundos (Fig. 1D). El acto de desmontar a la hembra es lento y se caracteriza por un movimiento lateral de las patas delanteras. La expulsión del líquido seminal y espermatozoides está asociada con contracciones espasmódicas de los músculos esqueléticos, especialmente de la cadera, la región perineal así como de los cuartos delanteros y traseros. Durante la conducta copulatoria el macho puede presentar o no montas, y el número de intromisiones varia entre 7 y 15 antes de eyacular. Un macho sexualmente experto puede eyacular en menos de 5 minutos después de aparearse con una hembra receptiva, completando así una serie eyaculatoria. La eyaculación es seguida por un período refractario, denominado intervalo posteyaculatorio, en el que el macho entra a una

etapa de inactividad sexual y autoacicalamiento genital, donde comúnmente permanece echado lejos de la hembra. Este período dura de 4 a 8 minutos después de la primera eyaculación y se prolonga de 1-2 minutos más con cada eyaculación sucesiva de manera regular. Después del período refractario, el animal puede reiniciar la cópula y completar así una serie copulatoria. (Larsson, 1979; Larsson y Alhenius, 1986; Sachs y Meisel, 1988). El patrón copulatorio no parece ser sensible a alteraciones sensoriales. La privación del olfato, la visión y la sensibilidad de la piel en la cara de la rata no alteran la conducta de la rata en forma importante (Beach, 1942). Más aún, la anosmia producida por lesiones del bulbo olfatorio, la ceguera producida al cortar los nervios ópticos, así como la sordera, no afectan la copulación en ratas que han tenido cuando menos la experiencia de una serie copulatoria (Larsson, 1979).

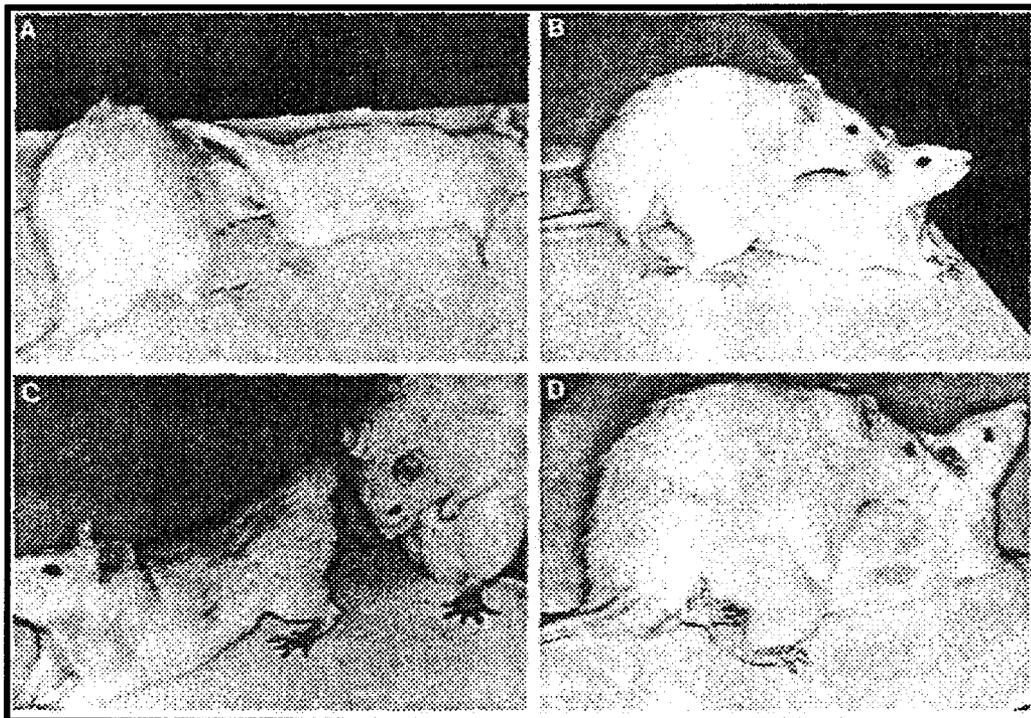


Figura 1. Conducta sexual en ratas. A, conducta precopulatoria, un macho investiga la región perineal de la hembra. B, Si la hembra está en estro, el macho la monta tomándola por los flancos traseros, es esta la misma posición que se adopta cuando existe intromisión, la diferencia estriba en que al realizarse la desmonta en la intromisión se realiza de manera violenta. C, poco después de ser desmontada, la hembra permanece en lordosis. D, después de algunas intromisiones el macho eyacula. Los patrones de monta e intromisión que se muestran son prácticamente los mismos que se presentan en las hembras. Modificado de Bakker (1996).

En la regulación de la conducta sexual masculina se han involucrado prácticamente todos los neurotransmisores y neuromoduladores. Sin embargo la mayoría de ellos presenta resultados contradictorios y únicamente la dopamina, el GABA y los opiodes presentan resultados consistentes a lo largo de la bibliografía. La dopamina esta involucrada en la activación de la conducta, mientras que el GABA en su inhibición y los opiodes en el reforzamiento sexual. (Revisiones: Bitran y Hall, 1987; Gu y Simerly, 1994; Hall y cols., 1997; McCarthy y cols., 1997; Sachs y Meisel, 1988).

La conducta sexual femenina se caracteriza por cuatro conductas típicas, 3 son de proceptividad y una de receptividad. Las de proceptividad son movimientos muy rápidos de las orejas (ear wiggling), saltos (hopping) y carreras cortas (darting), se postula que estos movimientos se llevan a cabo para llamar la atención del macho y provocar la cópula. La conducta de receptividad se denomina lordosis (Fig. 1C) y es una posición que facilita la penetración del pene a la vagina, al ser esta expuesta. Esta posición tiene diferentes grados de intensidad (Hardy y Debold, 1972), y se califica como 0 (sin lordosis), 1 (poca intensidad), 2 (levanta la cola y endereza la cabeza), o 3 puntos (levanta la cola y la cabeza). A partir de estos datos se puede obtener el coeficiente de lordosis (número de lordosis entre número de montas) y la intensidad de lordosis (suma de las intensidades de cada lordosis entre el número de montas), que representan índices de receptividad y proceptividad.

1.2 Diferenciación Sexual y Conducta Homotípica y Heterotípica

La diferenciación cerebral que se lleva a cabo en las etapas perinatales, se ha considerado como un factor decisivo en la expresión de la conducta sexual (Tobet y Fox, 1992). Desde hace tiempo se reconoce que la manipulación hormonal prenatal o en los primeros días de nacimiento es capaz de modificar la diferenciación cerebral y en consecuencia el patrón de conducta sexual y, en algunos casos, la morfología de los órganos sexuales.

Por mucho tiempo se ha considerado que durante la etapa fetal el cerebro es innatamente "femenino" y que en caso de que la carga genética determine un individuo macho, el cerebro se masculiniza a partir de una señal neuroendócrina. En el caso de la rata

un pico de testosterona en el último tercio de la gestación, induce la masculinización, Esto se comprobado al inyectar testosterona a la hembra gestante, ya que con esta manipulación las crías hembras se masculinizan tanto física como conductualmente (Tobet y Fox, 1992). Esta hipótesis sugiere la existencia de un "centro" de la conducta sexual masculina en el cerebro, este sitio recibiría a la testosterona e induciría la diferenciación sexual cerebral. Los trabajos que apoyan esta hipótesis consisten, por un lado, en la castración fetal de los machos, los cuales, en edad adulta, no exhiben conducta sexual masculina y muestran un aumento en la conducta sexual femenina (Hughes y cols.,1990; Meisel y Sachs, 1994; Stockman y cols, 1985), y por otro, en que la inyección de testosterona a la madre gestante provoca masculinización y defeminización en las crías hembras (Meisel y Sachs, 1994, Tobet y Fox, 1992). Ahora cabe definir los términos. La conducta homotípica es aquella que corresponde al sexo genético del animal, que un macho se comporte como tal y una hembra presente conducta femenina. Cuando un macho se comporta como hembra o una hembra como macho se habla de que presentan conductas heterotípicas, es decir, se comportan como los sujetos del sexo contrario (Emery y Sachs, 1975). Evidentemente al evaluar la conducta sexual masculina en una rata hembra uno se basa en el patrón conductual que se manifiesta, independientemente de que, por ejemplo, en el patrón de intromisión que se observe no puede existir inserción peniana por parte de la hembra.

1.3 Sistema de proyección vomeronasal

Actualmente se conocen los sistemas neuronales determinantes para el procesamiento de claves quimiosensoriales sexualmente relevantes. Se ha descrito que el órgano vomeronasal (OVN) tiene un papel fundamental en la expresión de la conducta copulatoria. En los roedores la atracción de la hembra depende de secreciones vaginales, las cuales son detectadas por el OVN del macho (Powers y Winans, 1975). Esta acción feromonal está involucrada en diferentes funciones reproductivas que incluyen el mantenimiento de la conducta sexual femenina y masculina (Commins y Yahr, 1984; Emery y Sachs, 1975), en la gestación (Halpern, 1987; Bellinger y cols., 1980), el ciclo estral (Ingersoll, 1931) y la conducta materna (Fleming y cols., 1979).

Después de que los receptores del OVN detectan las claves feromonales relevantes para la conducta reproductiva la información es enviada a los somas que se encuentran en el bulbo olfatorio accesorio (BOA). En el BOA se realiza un relevo con neuronas que proyectan a los núcleos anteromedial y posterocortical de la amígdala (AMG), y a el núcleo de la cama de la estria terminal (NCET) (De Olmos y cols., 1978 ; Scalia y Winans, 1975; Shipley y Adamek, 1984). Los núcleos anteromedial y posterocortical de la AMG envían proyecciones a otros núcleos, de las cuales las más importantes son las establecidas con el núcleo amigdaloides posterior y con el área preóptica media (APM) (Shiosaka y col., 1983). A este sistema se le conoce como el sistema o circuito de proyección vomeronasal (Fig. 2) y es sexualmente dimórfico (Segovia y Guillamon, 1993 y 1996). A continuación se describe cada una de las estructuras que forman dicho circuito, haciendo especial énfasis en el APM, área fundamental para la expresión de la conducta sexual masculina.

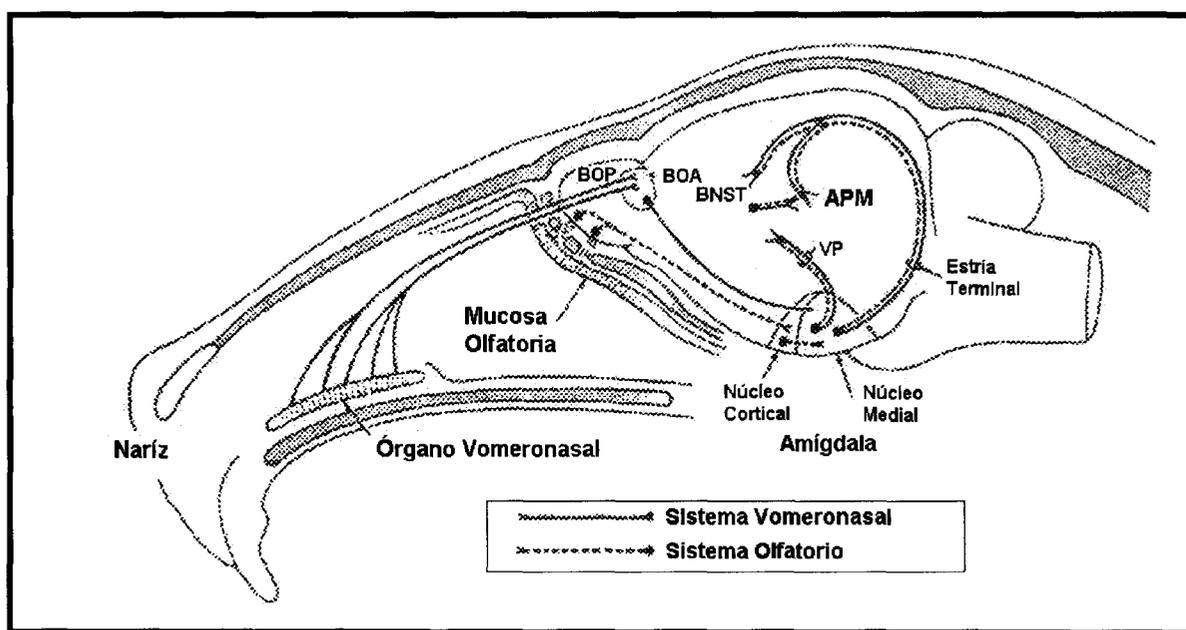


Fig. 2 Sistema de proyección vomeronasal. El sistema neuronal que participa en la detección de claves sexualmente relevantes y, por lo tanto, participa de manera importante en la regulación de la conducta sexual de la ratona macho inicia con la detección de estímulos sexualmente relevantes por el órgano vomeronasal, el cual transmite esta información al bulbo olfatorio accesorio (BOA) y este establece conexiones directas con la amígdala (AMG). Posteriormente la AMG establece conexiones tanto con el núcleo de la cama de la estria terminal (BNST), como con el área preóptica media a través de la vía estriatal y solo con el APM por la vía ventral (VP). En el esquema también se observa la vía que sigue la detección de olores propiamente dichos, que a diferencia de las claves sexualmente relevantes son detectados por la mucosa olfatoria que conecta directamente con el bulbo olfatorio principal (BOP). (Adaptado de Baum, 1992.)

1.3.1 Órgano vomeronasal

El OVN es un quimiorreceptor fusiforme que se encuentra localizado bilateralmente en la parte ventral del septum nasal. La interacción de las feromonas con este quimiorreceptor en el epitelio neurosensorial vomeronasal modifica la secreción de gonadotropinas, las cuales influyen en la pubertad, el ciclo estral, la gestación y en la conducta sexual tanto masculina como femenina (Hilensing y cols., 1979; Saito y Moltz, 1986). Están también involucradas en la mediación de la atraktividad sexual (Halpern, 1987; Romero y cols., 1990) y parecen estar fuertemente relacionadas con la inhibición del cuidado paterno mostrado por ratas macho (Menella y Moltz, 1988).

Cuando a ratas macho sexualmente expertas se les remueve el órgano vomeronasal se observa un aumento en la latencia de intromisión y en la latencia de eyacuación, así como un mayor número de montas. Fuera de estas alteraciones todos los machos que han copulado son capaces de eyacular (Saito y Moltz, 1986).

1.3.2 Bulbo olfatorio accesorio

El bulbo olfatorio accesorio es una estructura que descansa en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio mayor. El nervio vomeronasal transmite información desde el OVN al glomérulo del BOA (Paxinos, 1995). El BOA tiene proyecciones directas a la AMG media, específicamente a los núcleos corticales medial y posterior, el núcleo de la cama de la estría terminal y el núcleo del tracto olfatorio accesorio. Las neuronas en los blancos del BOA expresan receptores a esteroides, los cuales pueden ser modulados directamente por hormonas circulantes. El desarrollo del bulbo olfatorio accesorio está también influido por esteroides gonadales (Roos y cols., 1988) ya que aunque el BOA es significativamente más grande en la rata macho que en la hembra, si el macho es castrado tempranamente durante el desarrollo, tiene un BOA de un tamaño similar al de la hembra.

El BOA está implicado en la habituación, la agresión, la regulación de la temperatura, en conductas de evitación activa y pasiva, tiene funciones endocrinas y en la rata macho parece estar relacionado con la inhibición de la conducta sexual femenina (Edwards, 1974; Wenzel, 1974). En los primeros trabajos en los cuales se lesionaron los bulbos olfatorios se observaron déficits conductuales, que fueron atribuidos únicamente a la

anosmia. Actualmente se encuentra bien documentado que los bulbos olfatorios además de su papel olfatorio tienen importantes funciones integrativas (Cain, 1974).

La remoción de los bulbos olfatorios en la rata macho reduce el porcentaje de machos que eyaculan (Larsson, 1975; Meisel y cols., 1982). Este déficit en la eyaculación es generado por una incapacidad de algunos machos para iniciar la copulación (Larsson 1969; Meisel y cols., 1980) así como también una inhabilidad para mantener la copulación una vez iniciada (Meisel y cols., 1980). La administración de gonadotropinas exógenas o testosterona no altera los efectos de la bulbectomía sugiriendo que el daño en la copulación no es una consecuencia secundaria de la disminución de estímulos gonadales (Meisel y cols., 1980). En otras especies como son perros (Hart y Haugen, 1972), mono *rhesus* (Goldfoot y cols., 1978) gatos (Aronson y Cooper, 1974) y borregos (Fletcher y Lindsay, 1968) la anosmia periférica no altera significativamente la conducta sexual, aunque la conducta materna sí se modifica.

Por otro lado, ratas macho control y bulbectomizadas bilateralmente fueron probadas en una arena en donde el macho podía escoger el interactuar sexualmente con una hembra receptiva (en estro) o con una no receptiva (en anestro), o estar en un compartimento neutro. Los machos control copularon y mostraron una mayor preferencia por hembras sexualmente receptivas. La bulbectomía prácticamente eliminó la copula. Además, los machos bulbectomizados no mostraron preferencia por una hembra en estro sobre una en anestro, y pasaron su tiempo por igual con hembras receptivas, no receptivas y en el compartimento neutro (Edwards y cols., 1990). Los efectos de la bulbectomía en la preferencia de pareja y copulación pueden ser consecuencia de una inhabilidad severamente deteriorada para oler. La ausencia de preferencia de pareja y de copulación después de la bulbectomía puede reflejar un déficit en la habilidad del macho para hacer distinciones entre sus posibles parejas sexuales. Así mismo los efectos conductuales de la bulbectomía pueden considerarse como la incomunicación entre el ambiente y los núcleos realmente relevantes para la expresión de la conducta sexual, que tienen poco o nada que ver con el deterioro sensorial que se presenta posterior a la extracción del bulbo (Edwards, 1990). Resultados más consistentes y dramáticos en la pérdida de la conducta sexual se observan con lesiones bilaterales conjuntas del bulbo olfatorio principal y accesorio, ya que estas lesiones eliminan

por completo la copulación (Winans y Powers, 1977). Los estudios antes mencionados demuestran que las lesiones o extracciones de los bulbos olfatorios producen alteraciones importantes en la expresión de la conducta sexual masculina al interferir con el procesamiento de claves quimiosensoriales sexualmente relevantes.

1.3.3 Amígdala medial

La amígdala se localiza en la porción medial del lóbulo temporal, colinda con la parte final rostral de la formación del hipocampo y el límite anterior del asta temporal del ventrículo lateral (Price y cols., 1987). La amígdala está involucrada en una gran variedad de conductas y funciones regulatorias. Estas incluyen la emoción, memoria, la modulación de los sistemas autónomos y neuroendócrinos y en conductas sociales como la reproducción y la agresión (Price y cols., 1987).

El papel de la amígdala en el control de la copulación en roedores ha sido estudiado lesionando dos regiones: la amígdala córtico-medial (circundando los núcleos corticales y mediales), y la amígdala basolateral que incluye la región de los núcleos laterales y basales. La amígdala medial es el blanco de la vía vomeronasal cuyas neuronas presentan receptores tanto para los andrógenos como para los estrógenos (Simerly y cols., 1990; Stumpf y Sar, 1982). Las lesiones en la amígdala basolateral no tienen efectos sobre en la conducta copulatoria en ratas macho (Harris y Sachs, 1975) ni en hámster (Lehman y Winans, 1982). Por el contrario las lesiones en la amígdala corticomedial sí tienen efectos en la conducta sexual tanto de ratas como hámsters. Giantonio, Lund y Gerall (1970) fueron los primeros en demostrar que la lesión de la amígdala corticomedial puede alterar la copulación en las ratas macho. Los machos lesionados tienen latencias de eyaculación muy largas y pocas eyaculaciones. Los efectos sobre la conducta copulatoria de los machos lesionados en la amígdala corticomedial están en función de las condiciones hormonales de las ratas hembras, ya que si se usan en el experimento hembras tratadas únicamente con estradiol se observa un aumento de las latencias de eyaculación y en las frecuencias e intervalos de intromisión (Peirce y Nuttall, 1961). Cuando se usan hembras tratadas con estradiol más progesterona no se observan diferencias en la conducta sexual de las ratas lesionadas con respecto a las control. Los resultados de estos experimentos aún no están

bien explicados, pero se propone que ya que la amígdala recibe información de los nervios sensoriales de la región genital (Carrer, 1978), una sensibilidad genital inadecuada puede influir en la inhibición de la conducta.

1.3.4 Núcleo de la cama de la estría terminal

En 1923 Johnston describió el NCET como una estructura del cerebro anterior que es una masa prominente de materia gris rostral al núcleo olfatorio y caudal a ciertos componentes del complejo amigdalóide (citado en Allison, 1953). Algunos autores han considerado que el núcleo de la cama de la estría terminal es una extensión de la amígdala. (Allison, 1953)

El NCET está involucrado en aspectos fisiológicos y conductuales de la reproducción. Lesiones del NCET y de la misma estría terminal generan déficits copulatorios en las ratas aumentando el número de intromisiones precedentes a la eyaculación, el intervalo entre intromisiones y consecuentemente la latencia de eyaculación (Gianfonia y cols., 1970). Los efectos de las lesiones en el NCET son muy similares a los generados mediante lesiones en la amígdala corticomedial, lo cual sugiere que el NCET sirve principalmente para el relevo de información desde la amígdala a otras áreas como son el núcleo medial preóptico (Benjamin y cols., 1982).

El NCET y la amígdala corticomedial están principalmente involucrados en el mantenimiento de la conducta copulatoria y en la ejecución de la eyaculación. Aparentemente también integran el sistema neural que controla parcialmente la iniciación de la conducta de copula y el reinicio de la conducta copulatoria después de la eyaculación (Emery y Sachs, 1976).

1.3.5 Área Preóptica Media

El APM se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y la comisura anterior, tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y la división media del núcleo de la cama de la estría terminal respectivamente. El APM forma conexiones con varias regiones cerebrales. Se han identificado conexiones recíprocas (tanto aferentes como eferentes) entre el APM y el septum lateral, el NCET la amígdala medial, varios núcleos hipotalámicos

(incluidos el lateral, paraventricular, ventromedial y arcuato), el giro central, núcleo del raphe (dorsal y medio), el área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario (Chiba y Murata, 1985; Conrad y Pfaff, 1976; Simerly y cols., 1986; Simerly y Swanson, 1988). Otras eferentes importantes del APM llegan a todas las regiones de la zona periventricular del hipotálamo, núcleo acumbens, caudado putamen, pálido ventral y el núcleo tegmental dorsolateral.

Dado que el APM forma diversas conexiones neuronales con una gran cantidad de regiones del cerebro, se ha implicado en diversas funciones como son: la regulación endócrina de la gonadotropina pituitaria, la liberación de prolactina, termoregulación, sed hipovolémica así como en el control de la conducta materna y sexual (Chiba y Murata, 1985; Conrad y Pfaff, 1976; Simerly y cols., 1986; Simerly y Swanson, 1988). En el control de la conducta sexual masculina se encuentran involucradas vías aferentes al APM desde el órgano vomeronasal, las cuales transportan información quimiosensorial vía el BOA, la AMG medial y la porción encapsulada del NCBT (Scalia y Wimmans, 1975).

A pesar de que lesiones de diferentes estructuras cerebrales pueden afectar de alguna forma la expresión del patrón copulatorio, la mayoría de los autores coinciden en que el área preóptica media parece ser la estructura más importante en el control de la conducta sexual masculina. Por tal motivo se han llevado a cabo experimentos en esta región con resultados sorprendentes, lesiones electrolíticas bilaterales del APM alteran la conducta sexual en la rata macho mientras que las lesiones unilaterales en la misma región carecen de efecto (Lick, 1968). Cuando las lesiones son pequeñas, la alteración de la conducta sexual es temporal pero cuando la lesión es suficientemente grande, la conducta sexual desaparece por completo (Hcimer, 1966/1967). Las alteraciones conductuales no dependen de un sólo tipo de lesión ya que los efectos se observan también con lesiones producidas por la aplicación de ácido iboténico (Hansen y cols, 1982), radiofrecuencia (Lupo y cols, 1983) y cortes con cuchillo (Szechtman y cols, 1978). Más aún, efectos similares producidos por la lesión del APM se han descrito en diferentes especies como son: pollos, ranas, ratones, hámsters, cabras, gatos, perros y monos (Hart y Leedy, 1985; Larsson, 1979; Sachs y Meisel, 1988)

Destaca un experimento en la comprobación de que el APM sea una región, tal vez la más importante, que participa en la regulación de la conducta sexual masculina. Arendash

y Gorski (1982) trasplantaron tejido fetal masculino correspondiente al APM en ratas hembras de pocas semanas de edad. En la edad adulta, estas hembras presentaban un aumento de la conducta sexual femenina pero también de conducta sexual masculina, el aumento de la conducta sexual masculina se dio en comparación con los controles, ambos grupos fueron tratados con testosterona (Arendash y Gorski, 1982). En este sentido se debe mencionar que no existe ningún experimento en el que se induzca conducta sexual masculina a hembras ovariectomizadas sin que se les trate con hormonas, (Slob y cols, 1987).

Por otro lado, las deficiencias en la conducta sexual producidas por lesiones bilaterales del APM no se asocian con alteraciones del eje hipófisis-gónadas o alteraciones de los mecanismos de erección o eyaculación (Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Lupo y cols, 1983; Stefanick y Davidson, 1987). Los tratamientos con testosterona y los procedimientos que inducen conducta sexual en ratas poco activas sexualmente (reemplazo de la hembra, manipulación del macho, choques eléctricos al macho) no restablecen la conducta sexual en ratas con lesiones en el APM (Caggiula y cols., 1974; Heimer y cols., 1966/1967; Lisk, 1968; Stefanick y Davidson, 1987). Las deficiencias conductuales producidas por la lesión parecen ser permanentes, ya que no se ha detectado recuperación de la conducta en animales aún 8 meses después de la lesión (Ginton y Merari, 1977).

Se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicar los mecanismos por los que la lesión del APM afecta la conducta sexual. Las ratas macho entrenadas para responder instrumentalmente y obtener acceso a una hembra receptiva, dejan de copular pero siguen mostrando la respuesta instrumental después de lesionar el APM (Everitt y Stacey, 1987). Se han descrito resultados similares usando el paradigma de preferencia sexual o el de preferencia de lugar. Utilizando estos procedimientos se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM prefieren la compañía de una hembra receptiva o estar donde ésta estuvo, sugiriendo que el APM está involucrada en las respuestas motoras y no en las motivacionales relacionadas con la conducta sexual (Hughes y cols., 1990; Paredes y cols, 1998). Otros estudios que apoyan esta hipótesis, han demostrado que animales con lesiones en el APM muestran interés por la hembra y despliegan montas incompletas (Hansen y cols., 1982). Más aún, monos *rhesus* lesionados en el APM no despliegan conducta copulatoria pero se masturban y aprietan la palanca para obtener la compañía de una hembra (Slimp y cols., 1978).

Aunque los datos arriba descritos demuestran que la ausencia de la conducta sexual en animales con lesiones en el APM se debe a alteraciones relacionadas con la ejecución de la conducta, existen también datos que sugieren que al lesionar el APM se producen alteraciones en los mecanismos motivacionales. Por ejemplo, se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM muestran menor preferencia por una hembra receptiva que los animales control. Esta preferencia disminuye aún más al aumentar el tiempo de prueba después de la lesión, sugiriendo que la conducta desaparece por una reducción en la motivación sexual (Edwards y Einhorn, 1986). La copulación asociada a la estimulación y la inducción de la conducta sexual en animales no copuladores producida por el kindling facilitan los aspectos motivacionales de la conducta sexual (Madlafousek y cols., 1970; Paredes y cols., 1990).

La tercera hipótesis sugiere que el APM está involucrada tanto en los mecanismos relacionados con la ejecución como los de motivación de esta conducta. Por ejemplo, algunas ratas con lesiones en el APM despliegan algunas montas e intromisiones pero no alcanzan la eyaculación (Ginton y Merari, 1977). Cuando se realizan cortes dorsales y sagitales de las fibras que llevan información del o hacia el APM, se producen alteraciones conductuales diferenciales relacionadas tanto con la ejecución como con la de iniciación de la conducta respectivamente (Szechtman y cols., 1978). La estimulación eléctrica del APM (Merari y Ginton, 1975) y la infusión de bicuculina en esta región (Fernández-Guasti y cols., 1985) reduce el número de intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio, y aumenta el número de eyaculaciones en el tiempo de prueba. Se han descrito resultados similares poco tiempo después de lesiones pequeñas del APM que afectan tanto los mecanismos motivacionales como los de ejecución relacionados con la conducta sexual (Paredes y Agmo, 1992).

Finalmente se debe mencionar que la estimulación eléctrica del APM facilita la conducta sexual. Esta facilitación involucra una reducción en el número de intromisiones necesarias para eyacular (Malsburi, 1971; Merari y Ginton, 1975; Van Dis, 1971) así como una reducción en la latencia de eyaculación y un aumento en el número de eyaculaciones durante la prueba (Merari y Ginton, 1975; Van-Dis, 1971). Asimismo, se observa una gran reducción en el intervalo posteyaculatorio (Madlafousek y cols., 1970; Malsbury, 1971;

Merari y Ginton,1975; Van-Dis, 1971). Estos efectos se observan únicamente durante el periodo de estimulación o inmediatamente después de haberse aplicado y se conoce como copulación asociada a estimulación. Otra forma de estimulación eléctrica, el kindling, al ser aplicado en el APM induce conducta sexual en animales no copuladores (Paredes y cols., 1990). El mismo procedimiento en la AMG no induce conducta sexual, sugiriendo que los cambios locales en el APM y no la propagación de la actividad neuronal producida por el kindling inducen conducta sexual (Paredes y cols., 1990).

1.4 Evaluación del funcionamiento del circuito de proyección vomeronasal

La detección del producto del oncogén c-fos se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales. La proteína Fos, producto del oncogén c-fos, forma un heterodímero con la proteína Jun, este heterodímero funciona como un factor de transcripción, el cual se une específicamente a una secuencia del ADN. Al unirse al ADN se activa el sitio AP-1, el cual regula la expresión de varios genes relacionados con el crecimiento, la reparación y la replicación del genoma. Fos y Jun son miembros de una gran familia de factores de transcripción, los cuales al sintonizar grupos y subgrupos de genes posibilitan a las células para responder a las demandas ambientales. El ARNm del gen c-fos se puede detectar después de 5 min. de estimulación, mientras que la expresión de la proteína Fos después de 30 min. (Smith y cols., 1993).

La presencia de los productos del oncogen c-fos, se ha convertido en una técnica confiable para detectar la actividad neuronal generada por estímulos particulares, este patrón de expresión de Fos es específico al tipo de estímulo aplicado. Por ejemplo, en experimentos donde se inyectan ratas con una solución hipertónica y se sacrifican después de 30 min., por ejemplo, se han localizado muchas células inmunoreactivas a Fos en el órgano subfornical, estructura circunventricular del cerebro involucrada en la en la regulación de los fluidos del cuerpo (Giovannelli y Bloom, 1992). De manera similar en investigaciones sobre tareas motoras o hipertermia en ratas se ha observado que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunoractivas a Fos en regiones cerebrales

implicadas con esos estímulos y no en otras áreas (Scammell y cols., 1993; Leite-Silveira y cols., 1995). Lo anterior nos pone de manifiesto que la actividad neuronal que se detecta utilizando la técnica de inmunorreactividad hacia Fos depende del tipo de estímulo aplicado, por lo que la detección de las proteínas producidas por genes tempranos como Fos, refleja las regiones neuronales involucradas en el procesamiento neuronal de un estímulo determinado.

También ya se ha utilizado la inducción de la proteína Fos como una técnica para medir la respuesta de los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual, sobre todo la respuesta del circuito de proyección vomeronasal de rata, tanto en machos como en hembras, a varios tipos de estímulos sexualmente relevantes (Paredes y cols., 1998). Trabajos en los que se ha utilizado la expresión de esta proteína como un marcador inmunohistológico de actividad neuronal, sugieren que la rata hembra tiene un patrón sorprendentemente similar al de los machos en respuesta a claves feromonales derivadas de una hembra en estró (Bressler y Baum, 1996). En otro estudio, realizado por Wersinger y colaboradores en 1993, sometieron tanto a las ratas a varios tipos de estímulo sexualmente relevantes. Sus resultados revelan que tanto en machos como en hembras gonadectomizadas y tratadas con estrógenos, se pueden observar patrones idénticos de inmunoreactividad hacia Fos en la AMG medial posterior, el NCET el tegmento dorsolateral (TDL) y el APM.

Los resultados anteriores demuestran claramente que la detección de la proteína Fos después de la exposición a claves sexualmente relevantes permite evaluar el funcionamiento del circuito de proyección vomeronasal. Estudios anatómicos previos realizados por varios investigadores han demostrado que este sistema de proyección vomeronasal es sexualmente dimórfico en la rata (Segovia y Guillamón, 1993, 1996). Trabajos en los que se ha utilizado la expresión de Fos como un marcador inmunohistológico de actividad neuronal, sugieren que la rata hembra tiene un patrón sorprendentemente similar al de los machos en respuesta a claves feromonales derivadas de una rata hembra en estró (Bressler y Baum, 1996).

Por otro lado Bakker y cols. (1995) demostraron que las claves quimiosensoriales de aserrín expuesto a hembras en estró aumentaban el número de neuronas marcada con anti-Fos en la amígdala medial posterior, el NCET y el APM de ratas macho que habían sido

castrados en la edad adulta y tratados crónicamente con estradiol. También observó aumentos similares en machos que habían sido tratados neonatalmente con un inhibidor de la aromataasa, 1,4,6-androstriana-3,17-dione (ATD, la cual bloquea la masculinización del núcleo dimórfico sexual del APM). Además, cuando expuso a sujetos macho a camas de machos sexualmente activos, solo se activaron las áreas periféricas (BOA y amígdala media anterior). No se activaron las áreas centrales (NCET y APOM).

El grupo de Paredes (1998), demostró que las ratas macho y hembras gonadectomizadas y tratadas con propionato de testosterona (PT) presentaban la activación del circuito a claves sexualmente relevantes, ya que los sujetos tratados con aceite no respondieron al olor de hembra receptiva.

Parece demostrado que la respuesta de las neuronas de éste circuito a claves quimiosensoriales derivadas de machos es diferente en ambos sexos, mientras que la respuesta a camas de hembras es igual en los dos sexos, y que la respuesta esta condicionada a la existencia de un nivel hormonal mínimo.

Se debe mencionar que la disrupción quirúrgica de la aferencia vomeronasal que llega al cerebro, atenua parcialmente el aumento de c-fos inducidos por cópula en diferentes partes del circuito de proyección vomeronasal (Dudley y cols., 1992; Fernandez-Fewell y cols., 1994).

Finalmente, como ya se ha mencionado, la estimulación eléctrica tipo kindling en el APM es capaz de inducir conducta sexual masculina en sujetos que previamente eran incapaces de copular, sin embargo no se ha evaluado la respuesta del circuito en esos sujetos. Ahora pasaremos a revisar algunos aspectos de este tipo de estimulación, el kindling.

CAPÍTULO II. ENCENDIMIENTO ELÉCTRICO

2.1 Definición y Descripción del kindling

La administración diaria de estímulos eléctricos en cualquiera de varias estructuras cerebrales, en una amplia variedad de especies, llevan al desarrollo progresivo de convulsiones electrográficas y conductuales, este fenómeno, denominado encendido eléctrico (kindling), fue primeramente descrito por Goddard y colaboradores (1969) y ha sido utilizado como un modelo de epileptogénesis, y, la definición, en sus palabras es :

...Los cambios progresivos que resultan de la estimulación repetida serán referidos como el efecto del kindling... (Goddard, 1969).

Como varias cosas en ciencia el kindling se descubrió accidentalmente. El trabajo pionero de Goddard, quien tenía un fuerte interés en los mecanismos de memoria, consistía en someter a ratas macho durante varios días a trenes de estímulos eléctricos subumbrales por un segundo en un área del sistema límbico, la amígdala. Trabajaba en ese momento en la influencia que tenía esa estructura sobre la retención. Conforme transcurrían los días de estimulación observó que los animales presentaban primeramente convulsiones registradas por el electroencefalógrafo (postdescargas) y después de varias estimulaciones el animal presentaban convulsiones tónico-clónicas, como las que se presentan en la epilepsia. Sin embargo, lo que llamó su atención, fue que el cambio en respuesta a la estimulación parecía ser permanente o al menos de largo plazo (Goddard, 1967). A pesar de que el fenómeno intervino con el experimento en curso, Graham Godard reconoció que el cerebro estaba cambiando en respuesta a un estímulo constante, y que este cambio constituía una forma de plasticidad, la cual podría ser un modelo para la epilepsia parcial compleja. Actualmente el kindling esta ampliamente reconocido como un fenómeno de plasticidad sináptica en muchas especies, incluyendo primates (Wada y cols., 1974, 1978).

El trabajo de Goddard, como otros trabajos sobre memoria en la década de los 60's fue identificado como parte del fenómeno que Morrel y colaboradores habían denominado de "foco en espejo" (Morrell, 1969). Con este fenómeno, un foco epiléptico inducido en uno de los hemisferios inducía gradualmente un foco secundario independiente en el sitio homólogo del hemisferio contralateral. Morrel (1973) propuso que este mecanismo podría ser dependiente de los mismo mecanismos normalmente involucrados en el almacenaje de información. Por lo tanto Goddard tenía las bases para ver el "nuevo" fenómeno como un modelo potencial de memoria, con la ventaja adicional de que el kindling era más fácil y rápidamente inducible que el foco en espejo.

Goddard completo una amplia serie de experimentos que reforzaron su creencia de que los mecanismos de memoria y los de kindling se sobrelapaban (Goddard, 1969). Muchas de la similitudes fueron superficiales, sin embargo, el hallazgo inicial más prometedor fué simplemente la falta de un gran daño como correlato del kindling. Un cambio en la función del cerebro llega a ser doblemente interesante si se produce sin compañía de tejido dañado. En el reporte de 1969, Goddard y colaboradores examinaron el tejido que se encontraba alrededor del electrodo de estimulación con tinción de Nilss y no encontraron diferencias entre los animales con kindling y los controles. La mayoría de los datos, hasta 1998, no reportaron ningún cambio o algún forma de proceso de crecimiento (Goddard y Douglas, 1975 ; Racine, 1975 ; Racine y Zaide, 1978 ; Sutula, 1988).

2.2 Características electrofisiológicas para inducir kindling

Como se mencionó, en el fenómeno del kindling, las estimulaciones intracraneales de baja intensidad, repetidas y localizadas, llevan al desarrollo de postdescargas (PD's) focales, automatismos conductuales y, eventualmente a convulsiones motoras generalizadas (Goddard, 1969). Esta alteración gradual en la función y expresión cerebral, que cada uno de los elementos produce es permanente. El kindling es considerado como un modelo de epilepsia, plasticidad neuronal y memoria.

Ahora se conoce que el desarrollo de este fenómeno depende de la presencia de actividad cerebral eléctrica sincrónica, inducida por un estímulo eléctrico, la postdescarga (PD) (Racine, 1972a). En el modelo de kindling, las PD's están confinadas inicialmente al foco de estimulación, con el progreso del kindling las PD's se propagan, reclutando cada vez a una mayor cantidad de regiones cerebrales. Estas otras estructuras cerebrales son utilizadas entonces como vías para la propagación y generalización de las subsecuentes convulsiones (Ackermann y cols., 1986; McNamara, 1986 ; Racine y cols, 1988). Es decir que la estimulación por si misma no es la responsable de la crisis, sino la generalización de la PD.

Para inducir el kindling, el estímulo eléctrico debe ser dado periódicamente. En animales adultos, la estimulación continua o estimulaciones de 20 mA cada 30 minutos no inducen el kindling (Goddard, 1969; Racine, 1973 ; Peterson, 1981 ; Moshé, 1983). Comenzando con intervalos de una hora, la eficacia de los estímulos es mayor al aumentar el período de interestimulación (Goddard, 1969). La forma más común de estimulación consiste en aplicar una corriente sinusoidal o rectangular de 60 Hz por 1 o 2 segundos; sin embargo la frecuencias por arriba de 25 Hz son igualmente efectivas (Goddard, 1969 ; Racine, 1978). Aunque inicialmente se aseguraba que el kindling no podía producirse por estimulaciones de baja frecuencia, otros estudios aseguran que puede producirse a frecuencias tan bajas como 1.5 a 3 Hz aumentando el período de estimulación (10 a 60 seg) y la intensidad del estímulo (Cain y Corcoran, 1981 ; Lothman, 1985 ; Minabe, 1986. El subumbral (la cantidad de corriente por debajo de la mínima necesaria) para la generación de PD's puede disminuir gradualmente el umbral de PD (intensidad de corriente más baja capaz de producir una PD), si después de varias estimulaciones no es posible inducir PD's es debido a que ese sitio no puede ondudir el kindling. De este modo, como ya se mencionó, la aparición de las PD's puede ser considerado como un índice de epileptogenicidad del sitio estimulado, sin embargo el umbral para la PD no es capaz de predecir la velocidad con la cual aparecerá la convulsión generalizada de kindling (Zaide, 1974 ; Racine, 1977 ;Moshé, 1981).

2.3 Características conductuales del kindling

Las manifestaciones conductuales de las convulsiones provocadas por kindling dependen del sitio estimulado y de la especie animal. En la rata adulta, las convulsiones inducidas por del kindling amigdalino progresan a través de estados predecibles y característicos, descritos por primera vez por Racine (1972b) (tabla 1). Los estados 0-3 representan convulsiones focales (parciales), sin embargo al tiempo que ocurre el estado 3, la actividad convulsiva se ha propagado para involucrar al hemisferio ipsilateral. Los estados 4 y 5 representan una franca generalización de las convulsiones de diferente severidad. Pinel y Rovner (1978) han mostrado que estimulaciones posteriores inducen progresivamente convulsiones mas severas, clasificadas como estados 6-8. Después de un promedio de 348 estimulaciones, ocurren convulsiones espontáneas en las ratas, satisfaciendo el criterio más importante para establecer el kindling como modelo animal de epilepsia (McNamara, 1986 ; Wada y cols., 1986). Tradicionalmente, sin embargo, muchos investigadores consideran el

FASE	CARACTERÍSTICAS
0.	Prekindling : Aparición de postdescargas.
1.	Inmovilidad, movimientos masticatorios,
2.	Cabeceo (nodding),
3.	Clonos unilaterales de los miembros anteriores
4.	Clonos bilaterales de los miembros anteriores, el animal se para sobre sus miembros posteriores.
5.	Pérdida del equilibrio
6.	Ataques múltiples de levantamientos y caidas
7.	El animal corre antes de levantarse sobre sus miembros traseros y de perder el control de la postura
8.	Convulsiones espontáneas

Tabla 1. Estados del desarrollo convulsivo. Conductualmente se observa una actividad tónico-clónica, dividida en etapas de crisis, cuyo orden de aparición es el indicado. Al presentarse el estado cinco, y esto sucede después de varios días de estimulación, se considera que el animal ha desarrollado kindling (Racine, 1972). Las fases 6-8 son las propuestas por Pinel y Rovner en 1978, las cuales son utilizadas para usar al kindling como modelo de epilepsia.

desarrollo de las convulsiones generalizadas de los estados 4 o 5 como el punto final del kindling. El número de estimulaciones requeridas para el desarrollo de una convulsión generalizada ha sido llamada taza de kindling y es una medida de la habilidad del foco para propagarse a distancia a los sitios involucrados en la expresión conductual de las convulsiones, así como de la habilidad del medio circundante y de regiones lejanas del lugar de estimulación para limitar la propagación.

El fenómeno de kindling puede también inducirse químicamente, inyectando dosis convulsivantes o subconvulsivantes de carbacol, cocaína, lidocaína, glutamato y pentilinetetrazol (Vozu y Wise, 1975; Post, 1975, 1976; Mason y Cooper, 1972; Croucher y Bradford, 1990; Ito y cols., 1977; Vindrola y cols., 1983) con características electroencefalográficas y conductuales semejantes. Las regiones cerebrales que se han utilizado como vías de propagación del estímulo son varias, fundamentalmente se ha utilizado la amígdala por el menor número de estímulos requeridos, sin embargo, en teoría, la estimulación de cualquier núcleo cerebral llega a inducir el fenómeno (Racine, 1978).

2.4 Propiedades Básicas del Kindling

A pesar de que la fase 5 del kindling se considera como el estado final, el kindling, como ya se menciona, puede desarrollarse mas allá de este nivel debido a la presencia de convulsiones espontáneas. Los cambios causados por el kindling persisten por un tiempo largo, por lo que son vistos como permanentes o semipermanentes, ya que animales en fase 5 que han permanecido sin estimulación durante doce meses, responden con una crisis de fase 5 al ser estimulados nuevamente (Wada y cols., 1974; Dennison y cols., 1995). El número de estímulos necesarios para inducir una crisis epiléptica, es mucho menor a los utilizados la primera vez (Goddard y cols., 1969 ; McNamara, 1986 ; Racine y cols., 1988; Wada y cols. 1974), por lo que el kindling puede ser útil en el estudio de la plasticidad neuronal, sobretodo porque los efectos que produce, modificando de alguna manera la circuitería o la bioquímica cerebral, son efectos a largo plazo

El kindling también es considerado como un fenómeno general, ya que se ha demostrado en todas las especies que se han sometido al procedimiento, que van desde ranas

y reptiles hasta los gatos, perros y primates (Para revisión ver Fernández-Guardiola y cols. 1992). El fenómeno del kindling también ha sido encontrado en humanos, donde se ha observado una progresión semejante de las convulsiones por extirpación de tumores (Morrell, 1985). El kindling puede ser inducido en prácticamente cualquier núcleo cerebral (Racine, 1978), tal vez exceptuando el cerebelo (Maiti y Sneider, 1975).

Debido a que después de que un animal ha sido sometido al encendido eléctrico hasta lograr PD's electroencefalográficas y convulsiones conductuales, se puede provocar fácilmente una convulsión idéntica meses después con un menor número de estímulos que los requeridos la primera vez. Por esto se puede postular que el kindling es análogo al aprendizaje normal, si definimos aprendizaje como un cambio en la conducta más o menos permanente que resulta de la práctica, es posible que los componentes almacenados (engrama) involucren los mismos mecanismos fisiológicos como el engrama de la memoria a largo plazo (Goddard y Douglas, 1975). Los efectos del kindling resultan de una activación neuronal y no del daño de un tejido, un edema, gliosis u otro proceso biológico consecuente a la implantación del electrodo. Las características antes descritas hacen del fenómeno del kindling un modelo ideal para evaluar los cambios permanentes en el funcionamiento cerebral.

2.5 Mecanismos del Kindling

A pesar de que todavía no se conoce el mecanismo por el cual el kindling se produce y genera sus efectos, y aunque hay datos que apoyan la participación de los receptores a N-metil-D-aspartato (Holmes y cols., 1992; Hablitz y Langmoen, 1986; Herron y cols., 1985; Holmes y cols., 1990, Peterson y cols., 1983; Slater y cols., 1985; Steltzer y cols., 1987) dentro del mecanismo que modula el desarrollo y producción de las PD's que inducen el kindling, se han descrito varias hipótesis que tratan de explicar los mecanismos que subyacen a éste fenómeno. Se ha postulado que neurotransmisores como GABA, monoaminas, péptidos opiodes y benzodiazepinas participan en la inducción del kindling. También se han involucrado varios mecanismos subcelulares como la potenciación a largo plazo, la modificación de respuestas intrínsecas de células sensitivas y cambios en la síntesis de proteínas. Otras hipótesis que se han manejado involucran a varios sistemas de

neurotransmisores, así como a muchos de los mecanismos intracelulares (Revisiones: Corcoran, 1988; Racine, 1978; Racine y Burnham, 1984; Wada, 1990). Mas recientemente, algunas de las investigaciones tratan de entender los mecanismos moleculares que subyacen al kindling (Cain y cols., 1995; Watanabe y cols., 1996; Revisión: McNamara, 1995).

Parte de la dificultad para determinar los mecanismos subyacentes al kindling se debe al hecho que los varios patrones de activación neural que se conocen, pueden llevar a una amplia variedad de efectos post-activacionales de largo plazo. La activación neural excesiva, como los eventos epileptiformes, pueden producir un gran número de efectos, y cualquiera de ellos podría llevar al desarrollo de un estado epileptogénico.

Racine (1998) agrupa esos efectos en tres grandes categorías : 1) Los que reflejan un aumento de la conectividad dentro de sistemas excitatorios, 2) los que reflejan una disminución (o aumento) del nivel de funcionamiento dentro de sistemas excitatorios, y 3) los que reflejan un cambio en las propiedades intrínsecas de la respuesta neuronal, es decir que se vuelven más susceptibles a disparar incontrolablemente. A pesar de que todos estos efectos se han implicado en la epileptogénesis del kindling, ninguno se ha manifestado como esencial. Sin embargo se han propuesto cuatro diferentes mecanismos para explicarlos :

- 1) Aumento de la conectividad en las sinapsis preexistentes: Este fenómeno se ha confirmado ampliamente (Douglas y Goddard, 1975 ; Racine, 1972b; Racine y cols. 1975 y 1995; Russell, 1985). La potenciación inducida por el kindling (PIK), en muchos aspectos es muy semejante a la potenciación a largo plazo (PLP), la cual puede ser definida como un aumento en la intensificación sináptica por una estimulación breve, pero de alta frecuencia, de las aferentes excitatorias. Sin embargo, la PIK es diferente de la PLP en varias formas, en experimentos paralelos con PIK y PLP se sabe que la PIK tiene efectos más duraderos que la PLP, incluso no se sabe cuando termina el efecto potenciador de la PIK.
- 2) Brote (Sprouting) Axonal - Presencia de nuevas sinápsis: Más recientemente se ha observado que el kindling es capaz de inducir crecimiento axonal de las vías excitatorias del hipocampo. Específicamente el brote se induce en la fibras musgosas que van de las células granulares del giro dentado a las células piramidales del área CA3 del hipocampo.

En esta vía se ha mostrado el brote de colaterales posteriores dentro de la pared de células granulares (Sutula, 1998) y en el sitio blanco normal de las fibras musgosas del área CA3 (Ben-Ari, 1990 ; Represa, 1992). Todavía no está claro si este brote es un ejemplo de un aumento de la conectividad en la circuitería excitatoria que lleva a la epileptogénesis, pero esta sugerencia se ha hecho varias veces (Cavazos, 1991 ; Represa, 1992 ; Sutula, 1998).

3) Disminución de la Inhibición: Varios investigadores han intentado correlacionar la epileptogénesis con una inhibición de la transmisión. Usando pulsos pareados para medir la inhibición, se encontró que esta puede encontrarse en varios sitios, la mayoría de sistemas excitatorios, tal es caso del giro dentado (Tuff, 1983) y en la corteza piriforme (Racine, 1991). Estos dos sitios son en los que se han mostrado algunas de las más dramáticas alteraciones inducidas por activación en kindling y experimentos relacionados (Erfors, 1991 ; Hughes, 1993 ; Kairiss, 1984 ; Khurgel, 1992 ; McIntyre, 1982 ; McIntyre y Wong, 1986 ; Racine y cols., 1988). También se ha encontrado evidencia de aumento de la inhibición en el área hipocampal CA3 (Racine, 1983) y en la corteza entorrinal y perirrinal después del kindling (Racine, 1998). En sitios donde se ha encontrado reducción de la inhibición es en el área hipocampal CA1 (King, 1985), amígdala (Rainnie, 1992) y en el área CA3 del hipocampo en preparaciones *in vitro* (Zhao, 1992).

4) Pérdida Celular: Hallazgos clínicos son los que han proveído el terreno inicial para sugerir una relación entre la epileptogénesis y la pérdida neuronal. Frecuentemente la degeneración hipocampal es la característica más sobresaliente de la epilepsia del lóbulo temporal. Si existe daño o pérdida celular de los sistemas con función inhibitoria, entonces el aumento de la reactividad epileptogénica podría ser una consecuencia lógica. Algo similar en la epileptogénesis producida por el kindling llegó de un reporte en que existía pérdida celular en el hilus del giro dentado en animales con kindling (Cavazos, 1990). Esto fue controversial, ya que tanto Graham Goddard y R. Racine ya habían hecho conteos neuronales en el foco del kindling y no encontraron diferencias entre los sujetos con kindling y los controles. Sin embargo, ahora es claro que la pérdida neuronal puede ocurrir como resultado de la inducción de un estado epileptogénico (Ben-Ari, 1985 ; Nadler, 1980), aunque el efecto aún es controversial en la literatura del kindling.

En cualquier caso, se ha sugerido que algunas de las células perdidas en el hilus, en muchos modelos de activación epiléptica, son células que normalmente inervan interneuronas inhibitorias (Sloviter, 1991). Si esto es así, entonces esta pérdida celular podría alterar el balance entre la excitación y la inhibición.

2.6 Efectos del kindling sobre la conducta sexual

Como se ha mencionado, El grupo de Paredes es el único que ha relacionado el kindling con la conducta sexual masculina (Paredes y cols., 1990 ; Basañez, 1995). Como se ha mencionado, ellos estimularon el APM y la AMG de ratas macho que no presentaban conducta sexual, las conclusiones a las que llegaron fueron las siguientes:

- El kindling en el APM produce la aparición de la conducta sexual masculina en los animales no copuladores.
- Los resultados demuestran la importancia del APM para la expresión de dicha conducta y sugieren que en los machos no copuladores la conducta masculina no se manifiesta debido a que el APM se encuentre inhibida y el kindling es capaz de reactivarla.
- El encendido eléctrico pudiera ser un procedimiento que activara centros, regiones o núcleos de manera muy específica, a pesar de su efecto generalizado, ya que no se observa el mismo efecto en los sujetos con kindling en la APM con respecto a los estimulados en la AMG.
- Los cambios conductuales generados por el kindling son de efecto duradero puesto que los animales previamente no copuladores siguen mostrando la conducta sexual aún después de 10 meses de desarrollado el kindling.

Finalmente los autores sugieren que los cambios locales en el APM producidos por el kindling modifican los aspectos motivacionales de la conducta sexual, ya que se ha comprobado que no existen diferencias en cuanto a niveles de testosterona ni en la capacidad de erección peneana en los sujetos no copuladores (Stefanick y Davidson, 1987). Sin embargo, sus resultados también muestran que el kindling en el APM tiene efectos sobre los parámetros ejecutorios de la conducta sexual masculina sobre todo a largo plazo (Basañez, 1995).

2.7 Efecto del kindling sobre otras conductas

Los cambios conductuales provocados por el kindling, tanto eléctrico como químico, incluyen modificaciones en el sueño (Dahl y Dam, 1985) ya sea disminuyendo la cantidad de sueño lento o de sueño paradójico (Shouse y Sterman, 1983; Tanaka y Nacket, 1975), provoca una deficiencia en la capacidad de retención (Boast y McIntyre, 1977), y disminuye la capacidad de memorización (Stone y Gold, 1988). Sin embargo, el kindling en el hipocampo ventral no altera el aprendizaje, memoria o nivel de actividad (Holmes y cols., 1993). También se conoce que el kindling en la AMG provoca una disminución en la aversión a sabores y olores (Mikulka y Freeman, 1984).

El efecto del kindling en conductas complejas como la reproducción ha sido poco evaluado. Sin embargo, se sabe que el kindling en el APM de ratas hembras aumenta la conducta materna, reduciendo las latencias para reiniciar las respuestas maternas en comparación con las hembras control. Además presentan una mayor preferencia por el olor de un recién nacido en comparación con aquellas que no han recibido estimulación eléctrica (Morgan y cols. 1997).

El kindling también se ha relacionado con conductas aun mas complejas, como la ansiedad y la depresión, o conductas sociales como la agresión (Adamec, 1998).

CAPITULO III. TRABAJO EXPERIMENTAL

3.1 Planteamiento del problema

La aplicación de testosterona a hembras ovariectomizadas provoca un aumento de conducta heterotípica manifestándose en una mayor cantidad de patrones de monta e intromisión (Slob, 1987). Por otro lado, el kindling inducido en el APM (área implicada de manera importante en la regulación de la conducta sexual masculina) de ratas macho no copuladoras provoca la aparición de conducta sexual masculina en estos animales (Paredes y cols., 1990). El objetivo principal de este trabajo fue inducir el kindling en el área preóptica media de ratas hembras ovariectomizadas para tratar de facilitar la presentación de conducta sexual masculina al modificar el funcionamiento del APM con el kindling.

Por otro lado, se sabe que existen diferencias entre los efectos del kindling en el APM con respecto al producido en la AMG, por lo que se intentó determinar si la vía de propagación del kindling en el APM era diferente a la vía de propagación de la AMG para tratar de explicar en estos términos las diferencias reportadas. Para lo cual realizamos un registro simultáneo de estructuras importantes en la expresión de la conducta sexual masculina.

Finalmente se intento determinar si el circuito de proyección vomeronasal, respondía más fácilmente a claves sexualmente relevantes en los sujetos con kindling en el APM con respecto a los grupos SHAM y a los estimulados en la AMG después de 5 días con tratamiento con 2.5 mg/Kg de testosterona, dosis con la que los sujetos gonadectomizados normalmente no responden. La evaluación se realizó utilizando a la proteína Fos como marcador de la actividad neuronal. Tomando lo anterior en cuenta nuestras hipótesis fueron:

- H1: Las hembras estimuladas eléctricamente en el APM y tratadas con propionato de testosterona presentarán conducta sexual masculina (heterotípica) más fácilmente que las hembras control (SHAM) y que las estimuladas en la AMG.
- H2: El kindling producido en el APM tendrá diferentes vías de propagación al kindling inducido desde la AMG.
- H3: La respuesta del sistema de proyección vomeronasal a claves quimiosensoriales se relevantes será mayor en los sujetos estimulados en el APM con respecto a los animales estimulados en la AMG.

3.2 Metodología General

3.2.1 Sujetos

Para los experimentos se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar entre 250 y 320 g, con alimentación y agua *ad libitum*. Se mantuvieron en cajas individuales en un cuarto con temperatura constante y ciclo de luz invertido (se prendía a las 10:00 hrs y a las 22:00 hrs se apagaba).

Entre las 12 y 14 semanas de edad las hembras fueron ovariectomizadas (extirpación de los ovarios), para lo cual fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (70 mg/Kg), hidrocloreuro de xilazina (6 mg/Kg) y solución salina (0.9% de NaCl, 1 mL/Kg).

3.2.2 Implantación de electrodos:

Después de una semana de recuperación las hembras, previamente anestesiadas, fueron colocadas en el estereotáxico y se procedió a la implantación del electrodo. El electrodo bipolar fue de acero inoxidable montado en un conector de tres puntas, la tercer punta conectaba a un alambre de plata que se utilizaba como tierra. La implantación se realizó en el área preóptica media (grupo APM) o en la amígdala (grupo AMG). Para la implantación en el APM se utilizaron las siguientes coordenadas estereotáxicas a partir de bregma (intersección de los 2 huesos parietales y el frontal) : Anteroposterior (AP) = -0.5 mm, Lateral (L) = 0.5 mm y Profundidad (h) = 8.0 mm ; y las coordenadas para las hembras implantadas en la AMG fueron : AP = -2.5 mm, L = 4.25 mm, h = 8.0 mm, la h = 0 fue tomada a partir de la duramadre. Todos los electrodos fueron implantados del lado derecho, el alambre de tierra se colocó alrededor de uno de los cuatro tornillos (3 mm de largo) fijados previamente alrededor del electrodo, ese y los otros tres tornillos se utilizaron para sujetar el electrodo al cráneo con cemento dental (nic tone ®). Los animales implantados que no recibieron ninguna estimulación formaron el grupo control (SHAM).

3.2.3 Inducción del kindling:

Después de una semana de reposo las hembras fueron estimuladas eléctricamente a través del electrodo. Se utilizó un Estimulador marca Grass Mod. S48 y una unidad de estímulos aislados, marca Grass Mod. PSIU6. El estímulo eléctrico fue de 60 Hz durante 1 seg. El voltaje se determinó individualmente, hasta la aparición de la PD o hasta que fue evidente que el animal sentía el estímulo. Las hembras que no presentaron PD fueron eliminadas. Dos estímulos eléctricos se administraron diariamente dejando al menos 4 hrs entre un estímulo y el siguiente. Los estímulos se aplicaron hasta que el animal alcanzó la fase 5 en tres días consecutivos o hasta que cumplió 15 días de estimulación. Las PD fueron registradas a través del mismo electrodo conectado en circuito paralelo a un polígrafo Grass Mod. 7. Se registró la aparición y, en su caso, la duración de éstas, así como la fase conductual del kindling.

3.3 Experimento 1: Registro de Conducta Sexual

3.3.1 Objetivo

Evaluar la conducta sexual masculina y femenina de las hembras estimuladas en el APM y en la AMG tratadas con 2.5 y 5 mg/Kg de PT. La dosis de 5 mg/Kg se utiliza convencionalmente para inducir conducta sexual masculina, decidimos utilizar una dosis menor para observar si se presentaba dicha conducta y por lo tanto determinar si existía o no una facilitación del efecto de la testosterona sobre la inducción de la conducta sexual masculina en los sujetos con kindling y con PD en el APM.

3.3.2 Tratamiento hormonal

Los Animales de los tres grupos (SHAM, APM y AMG) fueron inyectados subcutáneamente con una dosis de 2.5 mg/Kg de propionato de testosterona (PT) por 15 días. A los 4, 9 y 14 días de tratamiento se les registró la conducta sexual femenina y a los días 5, 10 y 15 se registró la conducta sexual masculina. Después de este tratamiento se inyectó 5 mg/Kg de PT durante otros 15 días registrándose la conducta sexual en la misma secuencia que con la dosis baja.

3.3.3 Pruebas conductuales

Para el registro de conducta sexual se utilizaron cajas de madera con cristal frontal de 60x40x30 cm (LxAxH), con el piso cubierto de aserrín. La conducta sexual masculina fue evaluada utilizando hembras receptoras (tratadas con 25 µg de benzoato de estradiol 48 hrs antes de la prueba y con 1 mg de progesterona 4 hrs antes, ambos fármacos disueltos en aceite de maíz). Durante 30 minutos se registraron los patrones de monta e intromisión que presentaban las hembras experimentales. Se registró el tiempo de presentación del primer patrón de monta o intromisión a partir del inicio de la prueba, así como el número de veces que estos patrones se presentaron durante la prueba.

Para la conducta sexual femenina se utilizaron machos expertos, los cuales montaban a las hembras sin importar si estaban receptoras o no. Se registró el número de veces que las hembras presentaron lordosis (arqueamiento anterodorsal), posición característica de receptividad, en diez montas por parte del macho. A partir de estos datos se obtuvo el coeficiente de lordosis ($[\text{número de lordosis} / \text{número de montas}] \times 100$). Se cuantificó también la intensidad media de lordosis ($[\text{suma de la intensidad de cada lordosis} / \text{número de montas}] \times 100$), que tenía los siguientes valores: 0 = sin respuesta de lordosis ante una monta o intromisión, 1 = respuesta de lordosis en la que la hembra mostraba un ligero arqueamiento, 2 = respuesta de lordosis en la que la hembra mostraba un fuerte arqueamiento levantando tanto la cabeza como la cola.

222871

3.3.4 Resultados de la evolución del kindling en el APM y en la AMG

En esta descripción de resultados se utilizan únicamente los sujetos con kindling en el APM y en la AMG, debido a que se desea comparar las diferencia encontradas entre la evolución del kindling inducido en la AMG con respecto al kindling inducido en la AMG. En la figura 3 se observa la evolución de las fases conductuales del kindling entre los sujetos estimulados en el APM y la AMG con respecto al número de estímulos. Las hembras estimuladas en la AMG evolucionan hacia la fase 5 de kindling más rápidamente que las hembras estimuladas en el APM, lo cual se evidencia al comparar el número de estímulos necesarios para alcanzar la fase 5 del kindling (Fig. 4). Sin embargo, si se compara el número de estímulos necesarios para alcanzar la fase 5 del kindling a partir de la aparición de la PD no se observan diferencias (Fig. 5).

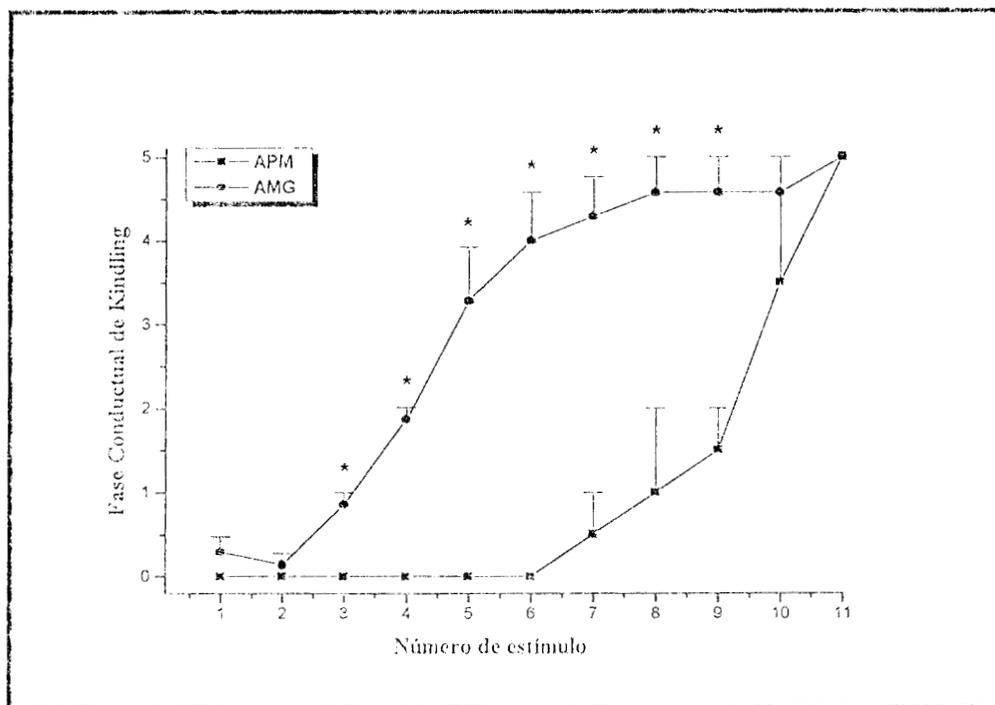


Figura 3. Evolución de las fases de kindling entre las hembras estimuladas en el APM o en la AMG, a partir de la primera estimulación. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes, * $p < 0.05$.

En la figura 6 se compara el voltaje requerido para inducir PD's en el APM y en la AMG. El voltaje requerido para las hembras estimuladas en el APM fue significativamente mayor al requerido por las hembras estimuladas en la AMG. Por otro lado, la duración de las PD's de los primeros estímulos fue significativamente mayor en las hembras estimuladas en la AMG que en las estimuladas

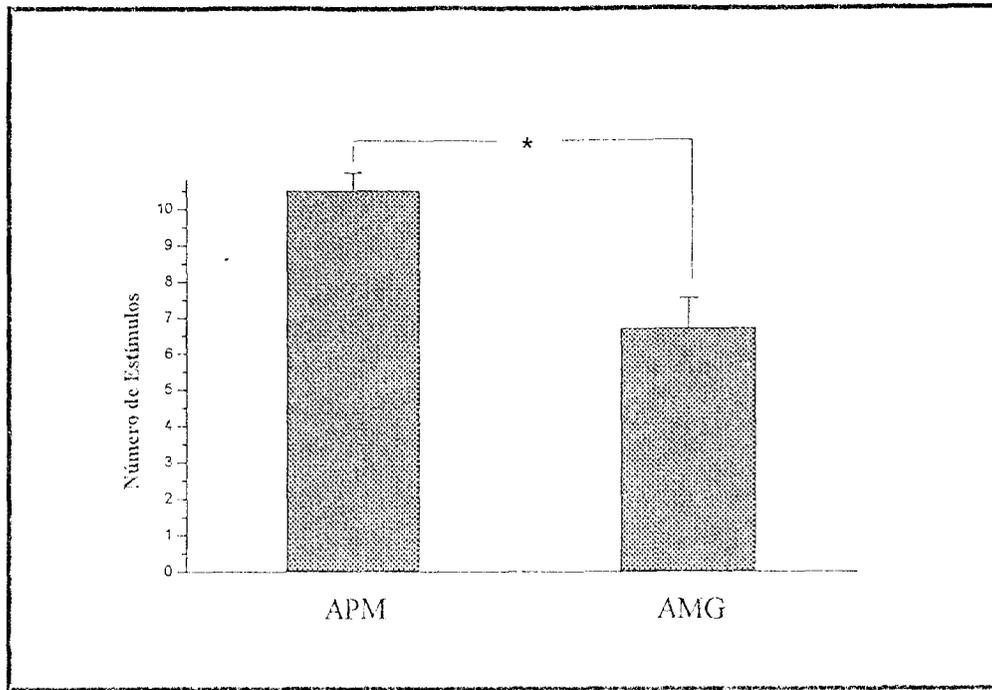


Figura. 4. Número de estímulos necesarios para llegar a la fase 5 de kindling, a partir de la primera estimulación en el APM y en la AMG. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes, * $p < 0.05$.

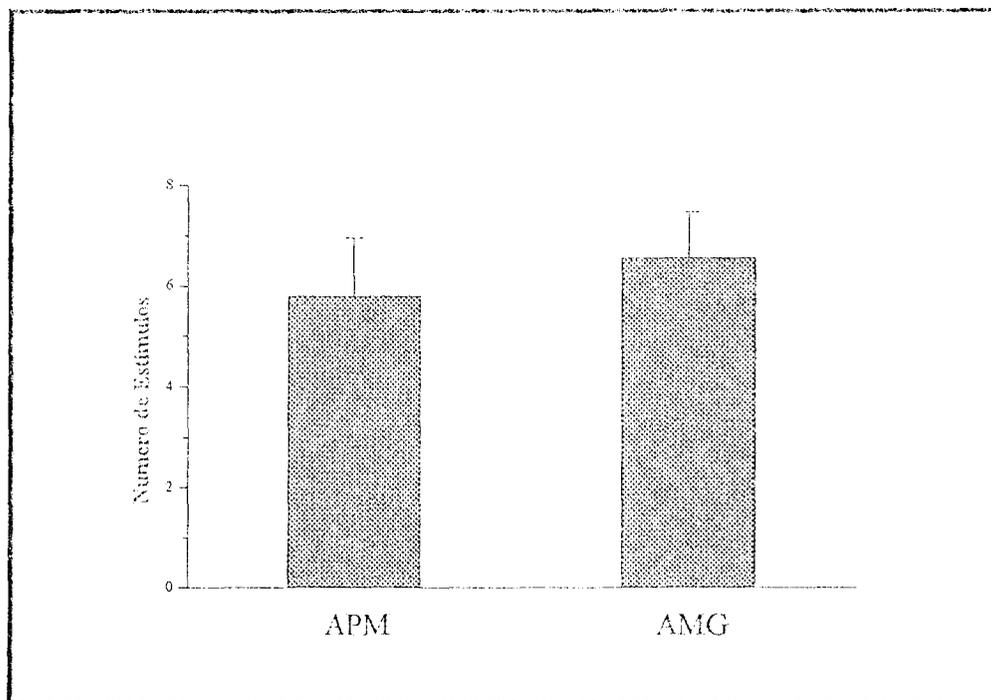


Figura 5. Número de estímulos necesarios para llegar a la fase 5 de kindling a partir de la presentación de la postdescarga en el APM y en la AMG. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes.

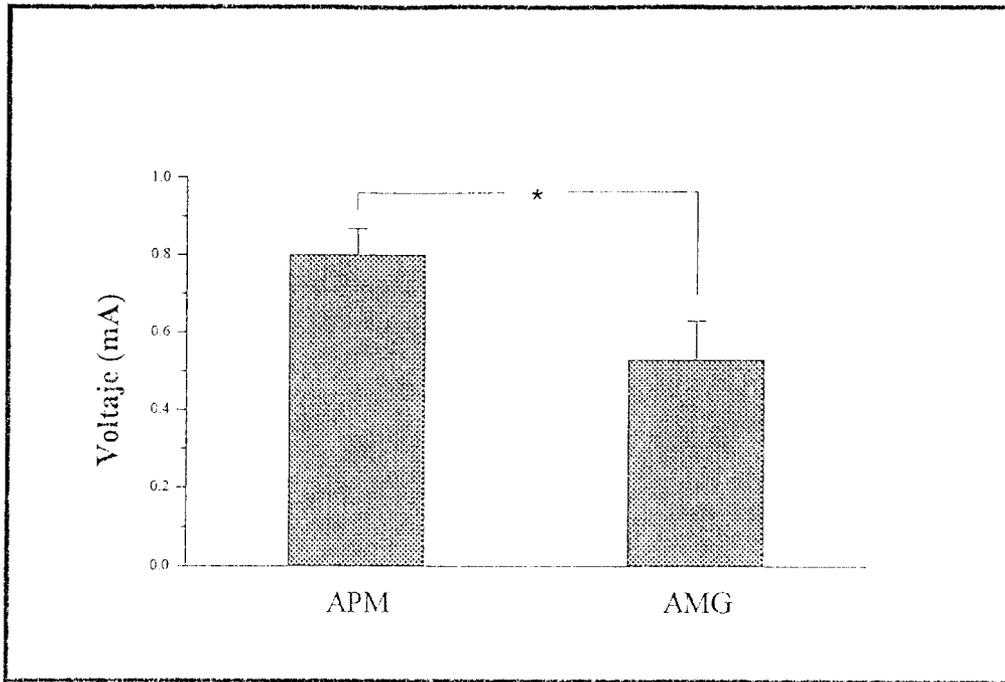


Figura 6. Voltaje requerido por las hembras con kindling en APM y en la AMG para inducir postdescargas. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes, * $p < 0.05$.

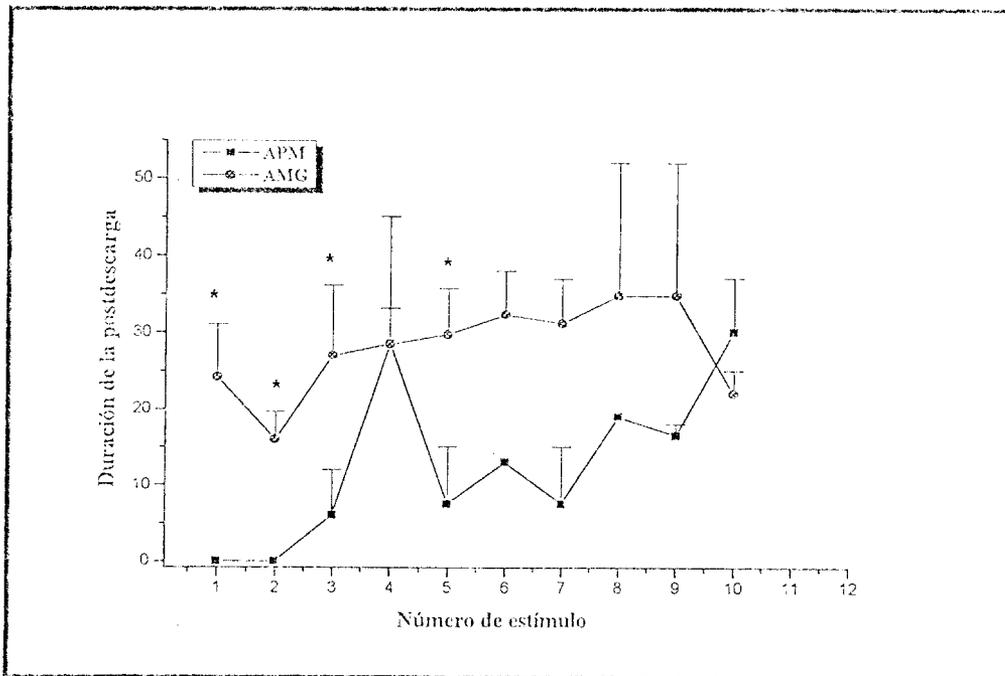


Figura 7. Duración de la postdescarga a partir de la primera estimulación en las hembras con kindling en el APM y en la AMG. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes, * $p < 0.05$.

en el APM (Fig. 7), sin embargo al comparar la duración de todas las PD's entre los dos grupos, a pesar de que es mayor en el grupo AMG ésta diferencia no es estadísticamente significativa ($p = 0.0871$) (Fig. 8).

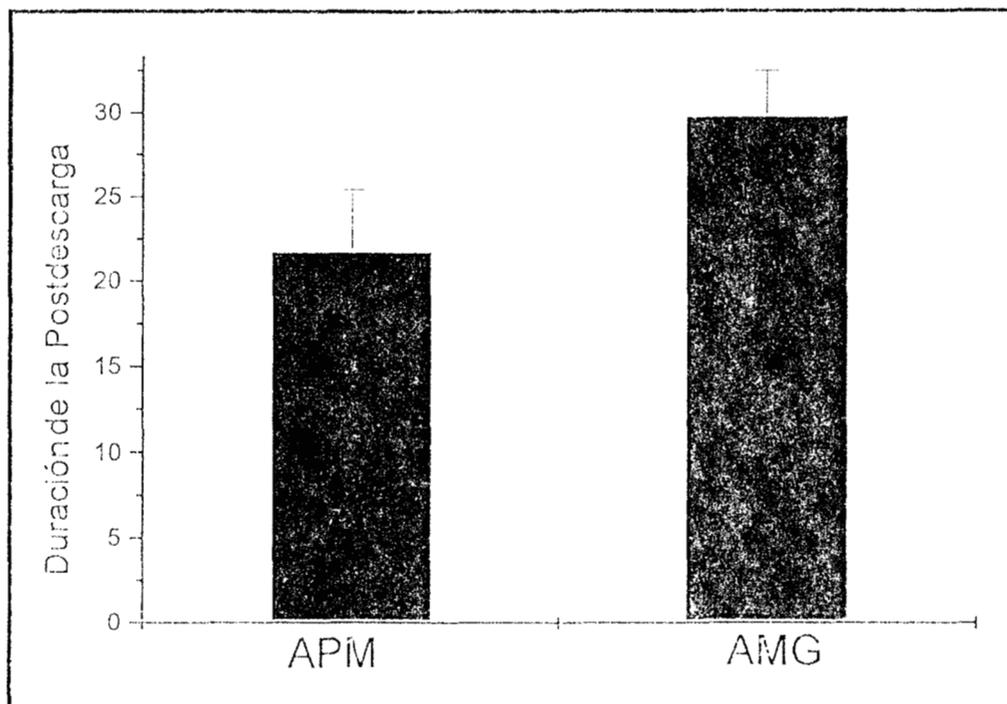


Figura 8. Duración del número total de postdescargas entre los grupos APM y AMG. Media \pm S.E.M. Prueba t-Student para grupos independientes.

3.3.5 Resultados de las pruebas de conducta sexual.

En las pruebas de conducta sexual femenina, no existieron diferencias entre los grupos, sobre todo por los bajos niveles de receptividad que presentaron (Datos no mostrados). La figura 9 muestra los porcentajes de sujetos en cada grupo que presentaron patrones de monta (arriba) y de intromisión (abajo) con la dosis baja (2.5 mg/Kg) o alta (5 mg/Kg) de PT.

Debido a que no todos los sujetos que recibieron estimulación en el APM llegaron a la fase 5 en 15 días de estimulación, se procedió a separar el grupo en dos, los que habían alcanzado la fase 5 del kindling (APMF5) y los que, aunque presentaron PD's, llegaron solo a las fases 1 o 2 (APMPD). Como se puede observar en la figura 9 el mayor porcentaje de sujetos que presentaron monta fueron los del grupo APMPD a los 5 y 10 días de tratamiento con la dosis baja de PT. No existen diferencias en este parámetro a los 15 días de tratamiento con la dosis alta de PT. Tampoco se encontraron diferencias en ninguno de los días de tratamiento con la dosis baja. Con respecto al porcentaje de

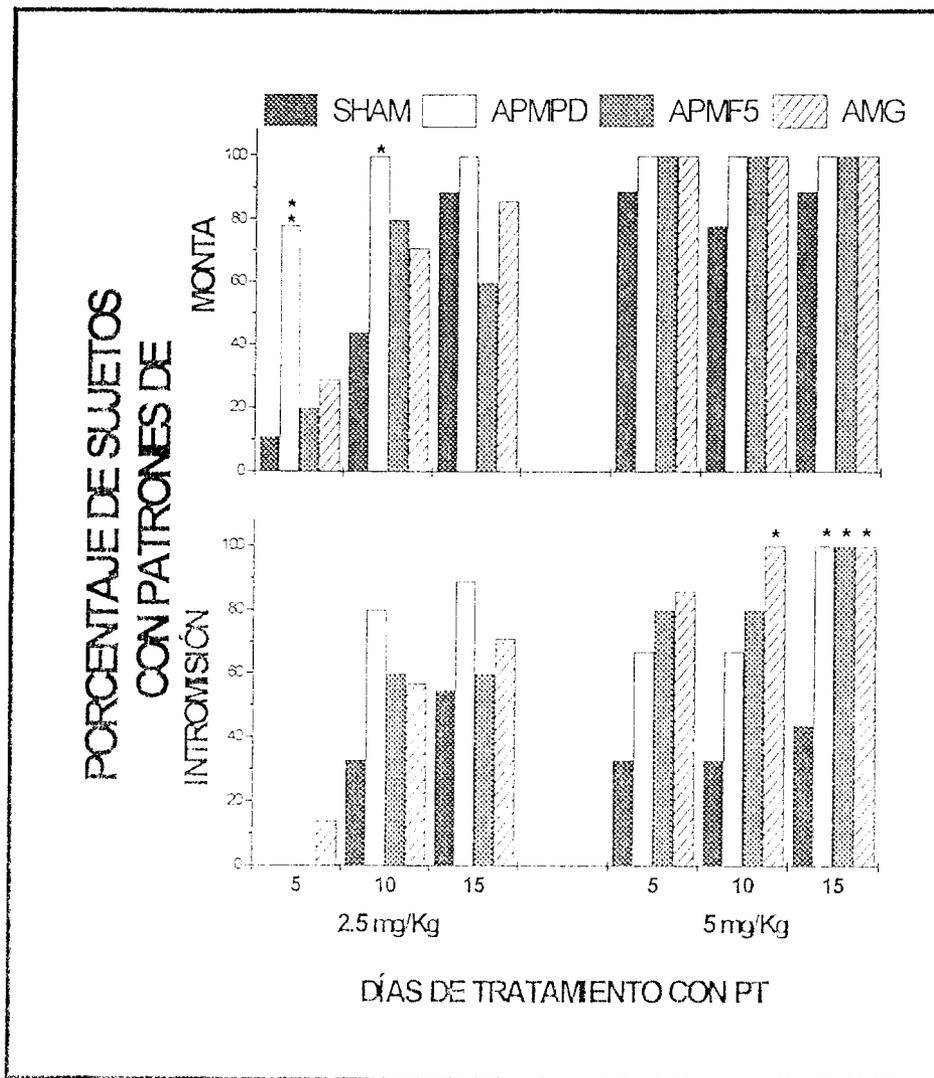


Figura 9. Porcentaje de sujetos que presentaron patrones de monta (arriba) o de intromisión (abajo) en las pruebas de conducta sexual masculina con dosis baja (izquierda) y alta (derecha) de propionato de testosterona (PT). Prueba χ^2 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al grupo sham.

sujetos que presentaron patrón de intromisión, existen diferencias significativas a los días 10 y 15 de tratamiento con la dosis alta de PT. Al día 10 sólo el grupo AMG fue diferente al grupo SHAM pero no fue diferente a los grupos APMPD y APMF5 y al día 15 todos los sujetos estimulados son diferentes al grupo SHAM. En la figura 10 se observan las latencias de la primera monta con la dosis baja y alta de PT. Al día 5 de tratamiento con las dosis baja de PT la latencia de monta del grupo APMPD fue significativamente menor con respecto al grupo SHAM ($F(3, 26)=3.859$; $p=0.0208$), mientras en el día 10 los dos grupos estimulados en el APM presentaron una reducción significativa en la latencia de monta en comparación al grupo SHAM ($F(3, 26)=6.029$; $p=0.0029$), no se presentaron diferencias entre el grupo AMG y SHAM. Con respecto a la dosis alta de PT, a los 10

días de tratamiento las latencias de monta en los tres grupos estimulados fueron menores a la del grupo SHAM ($F(3, 26)=3.47$; $p=0.0304$), diferencia que no se observa a los 15 días, debido a que el grupo SHAM disminuyó su latencia de monta. La latencia del primer patrón de intromisión se presentan en la figura 11. Esta latencia no difirió del grupo SHAM en ninguno de los días con la dosis baja de PT y tampoco a los 5 y 10 días de tratamiento con la dosis alta. Únicamente a los 15 días el grupo con kindling en el APM (APMF5) es significativamente diferente al SHAM.

En la figura 12 se muestra el número total de montas en los 30 min. de prueba a los 5, 10 y 15 días de tratamiento con las dosis baja (arriba) y alta (abajo) de PT. El grupo APMPD presentó un número de montas significativamente mayor al presentado por el grupo SHAM a los días 5 ($H(3,26)=8.447$; $p=0.0489$) y 10 ($H(3,26)=8.229$; $p=0.0418$) de tratamiento con la dosis baja de PT.

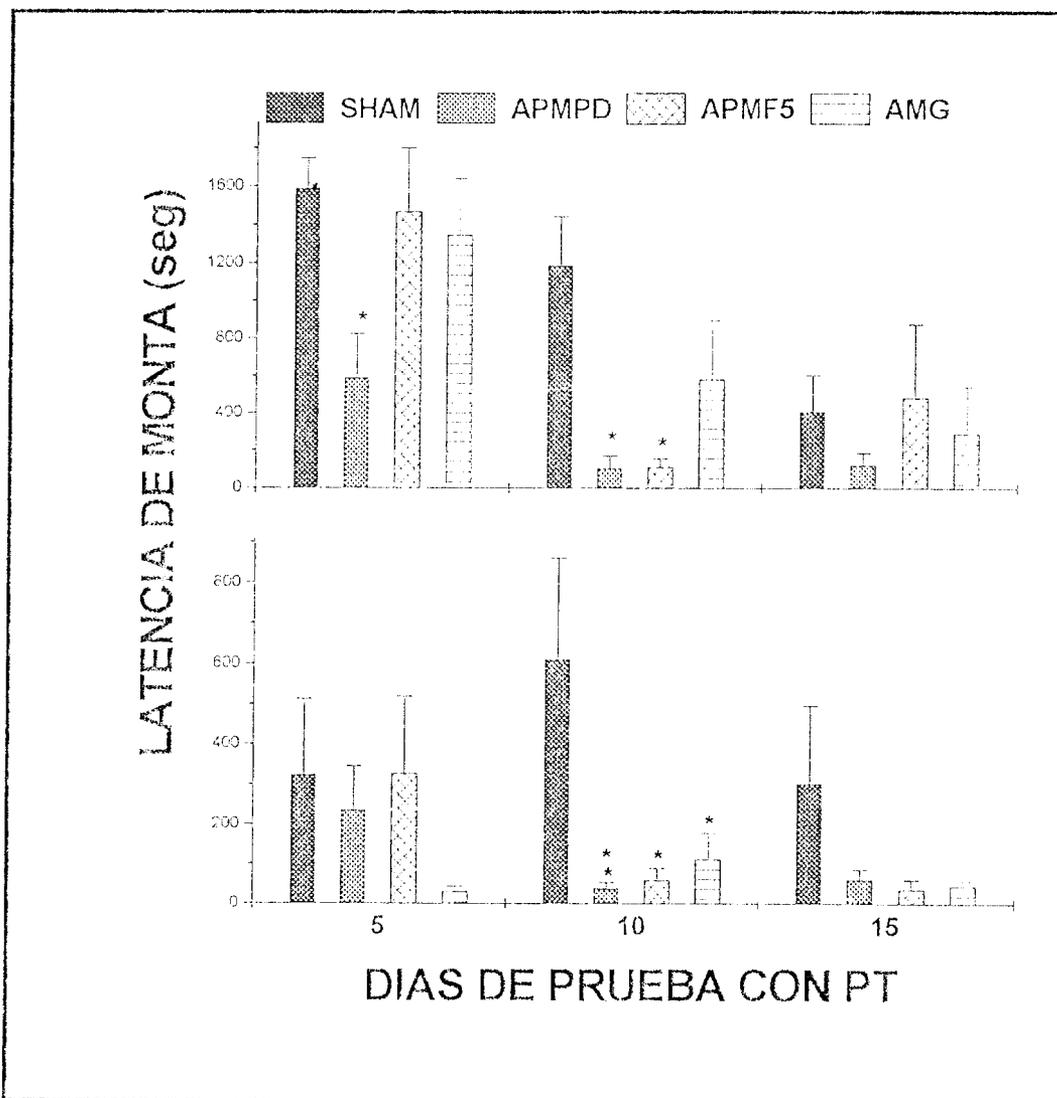


Figura 10. Latencia de la primera monta en 3 pruebas con dosis de 2.5 mg/Kg de PT (arriba) y 3 pruebas con dosis de 5 mg/Kg de PT (abajo). ANOVA seguida de prueba de LSD de Fisher. Media \pm S.E.M. Los asteriscos representan el nivel de diferencia significativa con respecto al grupo SHAM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

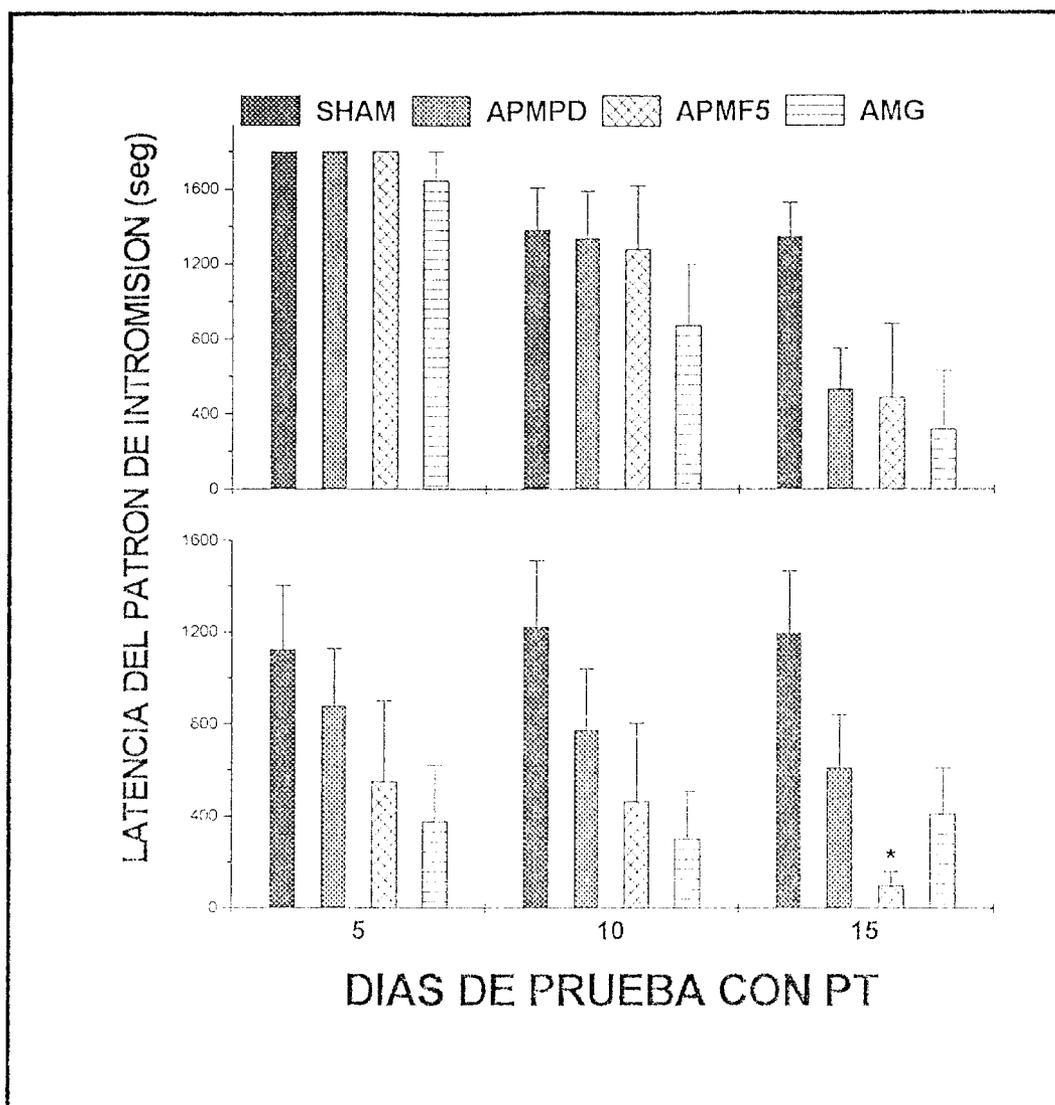


Figura 11. Latencia del primer patrón de intromisión en 3 pruebas con dosis de 2.5 mg/Kg de PT (arriba) y 3 pruebas con dosis de 5 mg/Kg de PT (abajo). Media \pm S.E.M. ANOVA seguida de prueba de Scheffé. * $p < 0.05$ con respecto al grupo SHAM.

El número de patrones de intromisión se muestra en la figura 13. La prueba H de Kruskal-Wallis no reveló diferencias significativas en ninguno de los días de prueba con la dosis baja de PT y tampoco para el día 5 de prueba con la dosis alta. Sin embargo, a los 10 días ($H(3,26)=9.4879$; $p=0.0235$) y 15 días ($H(3,26)=8.228$; $p=0.0415$) de tratamiento con la dosis alta los grupos estimulados realizaron un número mayor de montas con respecto al grupo SHAM. En ambos días el grupo APMF5 tuvo una diferencia mayor con respecto a los otros sujetos estimulados.

Los resultados obtenidos al evaluar la tasa de aciertos (hit rate = Núm. de patrones de intromisión / (Núm. patrones de intromisión + Núm. de montas)) tuvieron las mismas tendencias a las observadas en los patrones de intromisión (Datos no presentados).

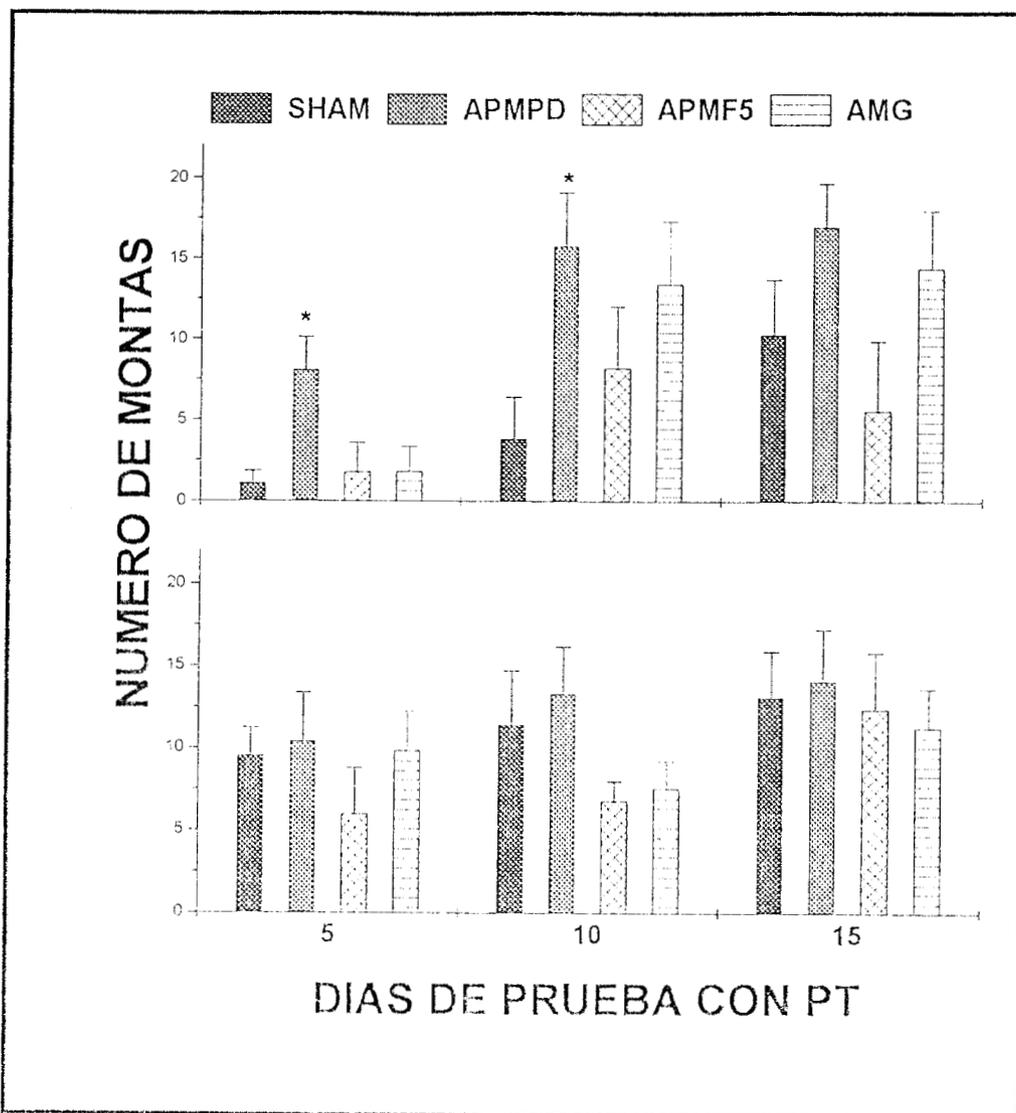


Figura 12. Número de montas que presentaron las hembras de los grupos control (SHAM), APMPD, APMF5 y AMG a los 5, 10 y 15 días de tratamiento con una dosis baja (2.5 mg/Kg) de PT (arriba) y alta (5 mg/Kg) de PT (abajo). Media \pm S.E.M. Prueba Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. * $p < 0.05$.

3.3.6 Discusión

Los resultados del presente experimento muestran que a pesar de necesitarse un mayor número de estímulos en el APM con respecto a la AMG, el número de PD's necesarias para alcanzar la fase 5 del kindling es muy similar. Previamente fue reportado (Goddard, 1969) que el APM requería de hasta 60 estimulaciones para alcanzar el kindling en comparación a las 15 necesarias para inducirlo en el AMG. Sin embargo, cuando ese estudio fue realizado no se reconocía la importancia de la PD para el desarrollo del kindling, y por lo tanto un estímulo estándar de 50 μ A fue utilizado. Paredes y cols (1990) atribuyen este hecho a que la mayoría de los estímulos que aplicaron Goddard y su grupo (1969) no provocaron la aparición de PD's, por lo que se provocó un mayor retraso en

alcanzar la fase 5 del kindling. En el trabajo del grupo de Paredes, al igual que nosotros en este trabajo, obtuvimos un promedio similar de PD's para alcanzar la fase 5 entre los animales estimulados en el APM y en la AMG. Sin embargo, en el presente trabajo se necesitó de una intensidad más alta (alrededor de 800 μ A) para inducir una PD en el APM, en comparación de la necesitada por Paredes y su grupo (alrededor de 450 μ A).

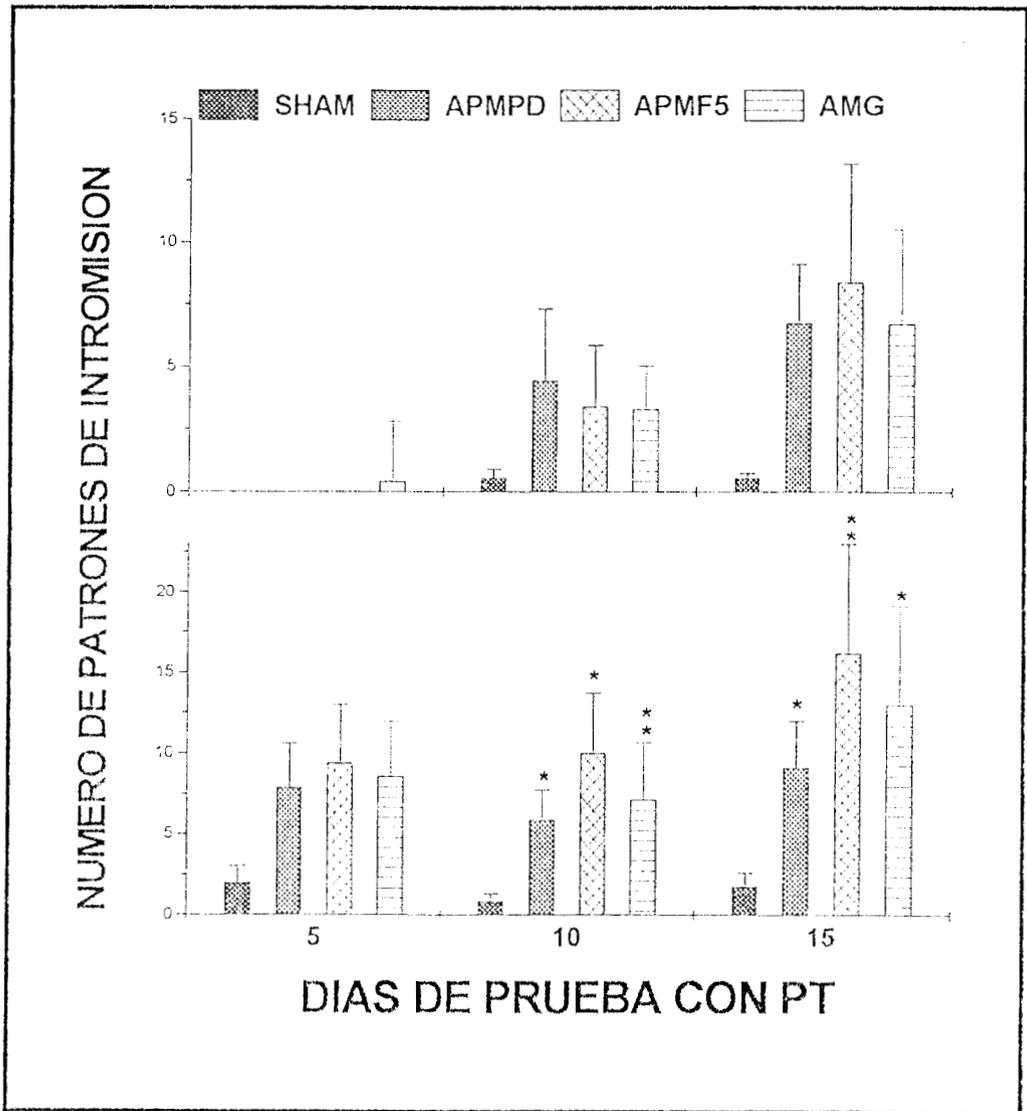


Figura 13. Número de patrones de intromisión en 3 pruebas con dosis de 2.5 mg/Kg de PT (arriba) y 3 pruebas con dosis de 5 mg/Kg de PT abajo. Media \pm S.E.M. Prueba Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al grupo SHAM.

La duración de la PD en el APM fue muy similar a la duración de la PD en la AMG, sobretodo cuando el kindling estaba establecido. En ambos casos el aumento de la duración fue gradual. Estos resultados también difieren de los obtenidos previamente (Paredes y cols., 1990) en los

que se describe que la duración de la PD en el APM es significativamente mayor a la duración de la PD en la AMG.

Las diferencias descritas (intensidad del estímulo y duración de la PD) las tenemos que atribuir al hecho de que los resultados que se describen en el trabajo de Paredes y cols. (1990) fueron obtenidos en machos, y los nuestros, en hembras, por lo tanto, además de haber sido difícil de inducir el kindling en el APM en comparación a la AMG, el APM de hembras probablemente sea más refractario al kindling que el de las ratas macho.

Como ya se ha mencionado, el kindling en el APM de ratas macho no copuladoras induce la conducta sexual masculina (Paredes y col., 1990) mientras que el kindling en esta área en ratas hembras facilita la expresión de conducta materna (Morgan y cols., 1997), estos efectos conductuales son de largo plazo (Basañes, 1995). En base a lo anterior se propuso que el kindling en esta región podría facilitar la expresión de la conducta sexual masculina también en hembras, por lo que se decidió evaluar el efecto del kindling en el APM y la AMG en ratas hembras ovariectomizadas sobre su conducta sexual masculina y femenina.

Se reconoce que la testosterona activa la cópula a partir de su efecto directo sobre el sistema nervioso (Davidson, 1966), sin embargo su efecto en hembras es débil, presumiblemente porque los mecanismos neurales que gobiernan la conducta sexual masculina están menos desarrollados en las hembras (Baum, 1972) (Ver parte 1.2). El grupo SHAM apoya estas observaciones ya que el 50 % de los sujetos nunca presento patrones de intromisión y el 50 % restante lo presento en pocas ocasiones, y, a diferencia de los otros grupos, los patrones de monta no se presentaron en el 100 % de las hembras, por lo que el tratamiento con PT no resultó completamente efectivo para inducir conducta sexual masculina en hembras ovariectomizadas.

Sin embargo, debido a que se ha demostrado que el tratamiento con PT (5 mg/Kg) puede inducir la conducta sexual masculina en ratas hembra ovariectomizadas, nosotros evaluamos si el kindling en el APM o en la AMG de ratas hembra puede facilitar la expresión de la conducta sexual masculina utilizando una dosis menor de PT a las requeridas normalmente. En nuestro experimento se observa que la aparición de PD en el APM de ratas hembra a una dosis baja de PT (2.5 mg/kg) facilita la expresión de patrones de monta, mientras que el tratamiento con 5 mg/kg de PT facilita los patrones de intromisión en los sujetos con kindling en el APM. El hecho de que se observara una facilitación del patrón de monta en los sujetos con PD en el APM y una facilitación del patrón de intromisión en los sujetos estimulados, sobretodo los que desarrollaron el kindling a partir del APM se debe discutir por separado.

222871

La copulación asociada a la estimulación en el APM ha sido reportada ampliamente (Malsbury, 1971; Merari y Ginton, 1975). Para nosotros es claro que un proceso similar se lleva a cabo en los sujetos con PD en el APM que no alcanzaron la fase final del kindling. Dado que la presencia de PD es un factor determinante para el desarrollo del kindling (Racine, 1972a) es muy probable que los efectos facilitadores de la testosterona sobre la conducta sexual masculina en las hembras estimuladas en el APM se vieron propiciados y se mantuvieron por la presencia de PD's disminuyendo la inhibición (Tuff, 1973; Racine y cols., 1991) del APM a estímulos sexualmente relevantes (hipótesis probada en el experimento 3) o aumentando la conectividad de sinapsis preexistentes (Douglas y Goddard, 1975; Racine, 1972b; Russell, 1985).

Los efectos del kindling en el APM sobre la facilitación de los patrones de intromisión se presentó únicamente con el tratamiento con la dosis alta de PT. El hecho de que la facilitación se presentara tardíamente con respecto a la facilitación observada en los patrones de monta podría significar que los mecanismos de facilitación son diferentes. Posiblemente el mecanismo involucrado en la facilitación de los patrones de intromisión tenga que ver con la formación de nuevas conexiones axonales como las observadas en el hipocampo (Sutula, 1998) las cuales tardan un mayor tiempo en desarrollarse que los mecanismos de disminución de la inhibición o de aumento de sinapsis preexistentes (Racine, 1998). Hay que notar, sin embargo, que no únicamente los patrones de intromisión fueron facilitados con el kindling en el APM, sino también, aunque en menor medida, en los otros sujetos estimulados en el APM o en el AMG. Esto lo atribuimos al hecho de que al desarrollarse el kindling y por ende ir reclutando un mayor número de estructuras (Racine, 1972a) llega el momento de que los eventos paroxísticos, también se presentan en el APM y en el tegmento dorsolateral (TDL) (ver experimento 2) por lo que probablemente esta estimulación indirecta de las estructuras que regulan de manera importante la conducta sexual masculina (Paredes y Baum, 1997) sea suficiente para facilitar únicamente un mayor número de patrones de intromisión con respecto al grupo SHAM.

Por otro lado, los efectos facilitatorios del kindling sobre la conducta copulatoria de las hembras tratadas con PT se podrían atribuir a un aumento de la dominancia de las hembras, considerando la dominancia como un estadio social superior de una hembra con respecto a otra. Se ha reportado que el kindling aumenta la conducta agresiva (Adamec, 1998) y se reconoce que al aumentar la agresividad aumenta la dominancia (la posición social) de las hembras, y esta se manifiesta en una actividad heterotípica elevada (Fang, 1999; Vasey, 1998), por lo que en este contexto, la facilitación de la conducta sexual masculina por kindling en el APM o en la AMG no

sería sorprendente. Sin embargo, dado que las hembras estimuladas en el APM presentan una mayor facilitación de la conducta sexual heterotípica que los estimulados en la AMG, creemos que a pesar del aumento en dominancia que pudiera provocar el kindling, el efecto de estimular y por tanto modificar la estructura que regula de manera importante la conducta sexual masculina es mayor al efecto que pudiera provocar el solo aumento en la agresividad.

Finalmente debemos mencionar que los patrones de intromisión también se vieron facilitados en los sujetos con kindling en la AMG con la dosis alta de PT, esto aparentemente refleja la participación de la AMG únicamente en los procesos ejecutorios de la conducta sexual masculina, ya que los parámetros que reflejan los aspectos motivacionales de la conducta no presentaron diferencias significativas. Resultados similares fueron observados en los machos no copuladores estimulados en la amígdala (Paredes y cols., 1990, Basañes, 1995).

3.4 Experimento 2: Registro múltiple durante la inducción del kindling en el APM o en la AMG

3.4.1 Objetivo

Determinar si el kindling en el APM utiliza una vía de propagación diferente al kindling inducido en la AMG utilizando un registro múltiple de la actividad cerebral durante la presencia de la PD.

3.4.2 Implantación y registro

Cuatro ratas hembras ovariectomizadas fueron implantadas con electrodos bipolares en el APM, la AMG, el NCET y el tegmento dorsolateral (TDL). Las coordenadas del APM y la AMG fueron las anteriormente mencionadas, las coordenadas, a partir de bregma, del TDL fueron AP: -5.5, L: -2 y h: -6.5 ; y para el NCET AP: +1.7, L: -1.3 y h: -7.45, este último a un ángulo de 70° a diferencia de los 90° de los otros. Los electrodos fueron colocados unilateralmente, del lado derecho. La mitad de los animales fueron estimulados en el APM y la otra en la AMG, registrándose simultáneamente las cuatro regiones.

Se intentó medir el tiempo que tardaba una espiga de PD en pasar de una región a otra, sin embargo no se logro encontrar una coincidencia obvia entre las espigas, entonces procedimos a contar el número de espigas por hoja de registro y el número de eventos paroxísticos (actividad eléctrica cerebral que tenía el doble de amplitud con respecto al registro base) durante cada sesión.

3.4.3 Resultados

El objetivo inicial de este experimento consistió en obtener la secuencia de propagación de la PD a partir del sitio de estimulación (APM o AMG), pero al tratar de obtener la secuencia a partir de las diferencias temporales entre las espigas de las diferentes áreas, nos percatamos de que el número de espigas por intervalo de tiempo no era el mismo en los cuatro sitios de registro (tabla 2), sin que se presentaran diferencias significativas entre ellos ($F(3, 44)=0.11629$, $p=0.9501$ para los estimulados en AMG, y $F(3, 40)=0.05426$, $p=0.9831$, en APM). Debido a que el número de espigas no era el mismo, no se logro obtener la secuencia de propagación, ya que no fue posible determinar que espiga de un sitio correspondía a la espiga generada en el área estimulada. En base a lo anterior nos preguntamos si los sitios registrados presentaban alguna relación en cuanto a sus frecuencias de disparo, por lo que se realizo un análisis de correlación lineal entre el número de espigas en el sitio estimulado con respecto al número de espigas presentes en los otros tres sitios de registro, para determinar si disparaban de manera independiente.

NÚMERO DE ESPIGAS DURANTE LA PD				
<i>Sitio de estimulación</i>				
<i>Área Preóptica Media</i>				
<i>Amígdala</i>				
<i>Registro de</i>	<i>media</i>	<i>error std.</i>	<i>media</i>	<i>error std.</i>
<i>Amígdala</i>	<i>24.81</i>	<i>1.05</i>	<i>28.66</i>	<i>1.98</i>
<i>Área Preóptica Media</i>	<i>24.90</i>	<i>1.11</i>	<i>25.5</i>	<i>1.53</i>
<i>Núcleo de la Cama</i>	<i>28.91</i>	<i>1.46</i>	<i>25</i>	<i>1.03</i>
<i>Tegmento Dorsolateral</i>	<i>30.64</i>	<i>1.36</i>	<i>26.75</i>	<i>1.42</i>

Tabla 2. Número de espigas en 6 segundos de registro de la PD. Los datos reflejan el promedio de espigas \pm SEM. Obsérvese que no son el mismo número de espigas en los sitios registrados, por lo que no fue posible determinar que espigas correspondían entre sí en los diferentes sitios registrados. No existen diferencias entre regiones estimuladas ni entre los sitios registrados.

En las figuras 14 y 15 se observan las pendientes obtenidas con el análisis de regresión simple en los sujetos estimulados en el APM y AMG, respectivamente. En todos los casos existió un coeficiente de correlación alto. En los sujetos estimulados en el APM el coeficiente de regresión ajustado para número de espigas en AMG, NCET y TDL con respecto al número de espigas en el APM fue 0.9929, 0.9888 y 0.995, respectivamente (coeficiente de regresión múltiple 0.9818), y para los sujetos estimulados en el AMG: 0.9153, 0.9481 y 0.8452 respectivamente para APM, NCET y TDL (coeficiente de regresión múltiple 0.9992).

Por otro lado, observamos que existía una tendencia en que cuando se estimulaba el APM, un mayor número de eventos paroxísticos aparecían en esa área y en el NCET; y cuando se estimulaba la AMG, aparecían en mayor número en la propia AMG y en el TDL. En la figura 16 se observa el porcentaje de aparición de eventos paroxísticos, (tomando en cuenta tanto PD como postdescargas) en cada sitio de registro cuando se estimulaba en el APM o en la AMG, gráfica que refleja la tendencia descrita.

Ejemplos de esta correlación se ilustran en las figuras 17 y 18. La figura 17 corresponde al registro de un sujeto estimulado en el APM, se señalan los eventos paroxísticos que se presentaron después de la PD y se observa como se encuentran únicamente en el APM y en el NCET. La figura 18 ejemplifica los eventos paroxísticos posteriores a la PD de un sujeto estimulado en la AMG y es claro que solo aparecen en la propia AMG y en el TDL.

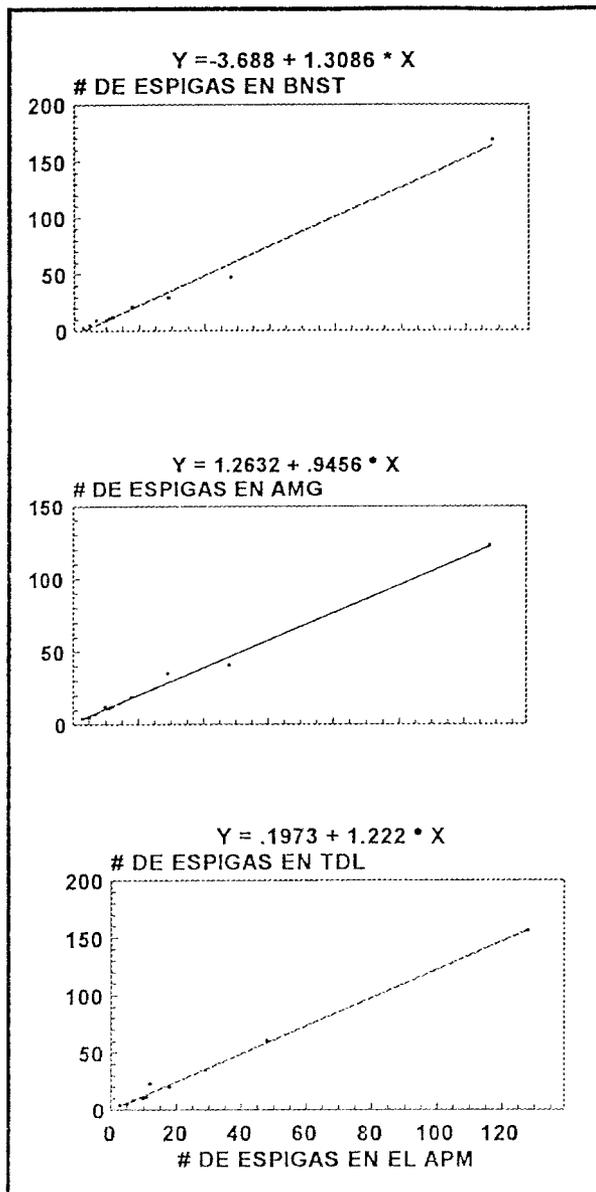


Figura 14. Regresión Lineal y ecuación obtenidos por el análisis de regresión simple del número de espigas entre el sitio de estimulación (APM) y el NCET, AMG y TDL.

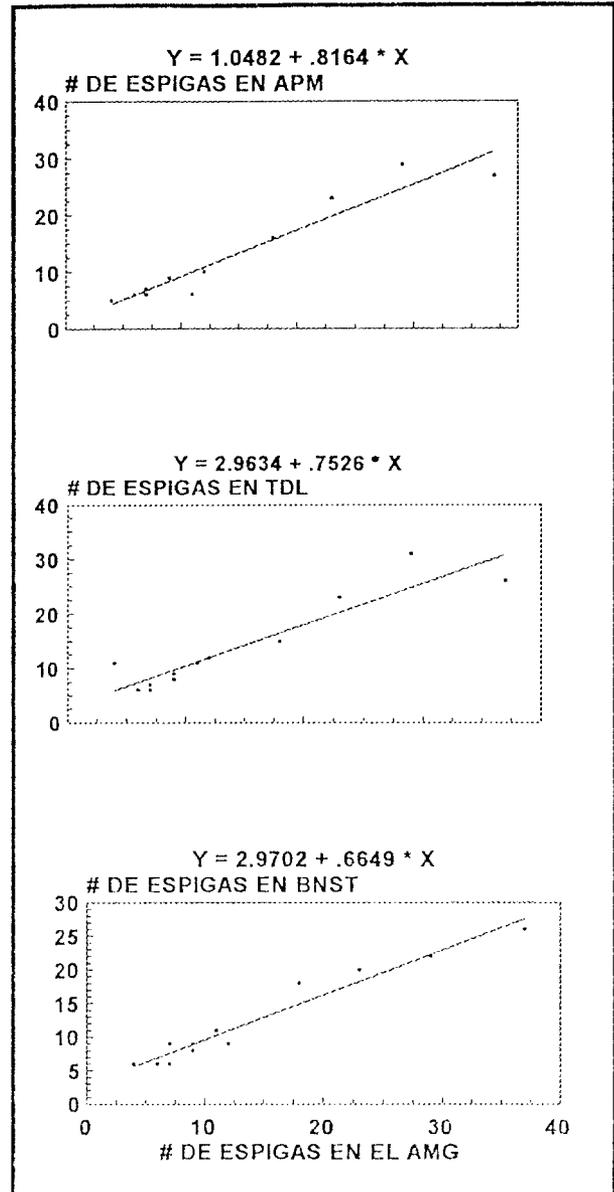


Figura 15. Regresión Lineal y ecuación obtenidos por el análisis de regresión simple del número de espigas entre el sitio de estimulación (AMG) y el APM, TDL y NCET.

3.4.4 Discusión

Se ha propuesto una posible vía de propagación del kindling a partir de la estimulación de la AMG (Löscher y Ebert, 1996) en el cual se postula que después del estímulo se recluta la corteza, sobretodo la piriforme, el núcleo acumbens y el caudado-putamen, posteriormente el núcleo entopeduncular y la formación reticular, después la habénula lateral, el hipocampo, el núcleo reticular, el núcleo pedúnculo pontino, la sustancia nigra y el tálamo, finalmente el estímulo se propaga a la médula espinal donde desata las convulsiones tónico-clónicas. Nosotros deseábamos conocer si la misma vía era utilizada por el kindling

en el APM, pero no podíamos poner electrodos en todas esas áreas en un solo animal, así que decidimos determinar las diferencias en propagación utilizando un sistema al que pertenecieran ambos sitios estimulados, por lo que decidimos registrar parte del circuito de proyección vomeronasal al que pertenece tanto el APM como la AMG; también escogimos el TDL ya que sabemos tiene conexión directa con el APM (Segovia y Guillamón, 1993 y 1996) y participa de manera importante en aspectos ejecutorios de la conducta sexual masculina (Paredes y Baum, 1997). Como se menciona en los resultados no fue posible determinar la secuencia de reclutamiento debido a que el registro en papel no nos permitió discriminar entre las diferentes espigas. Nosotros esperábamos que las regiones se fueran reclutando lentamente, que la primera estimulación reclutara una región, la segunda otra..., pero desde la primera estimulación en donde apareció la PD en la región estimulada, se observaron eventos paroxísticos en las otras regiones registradas.

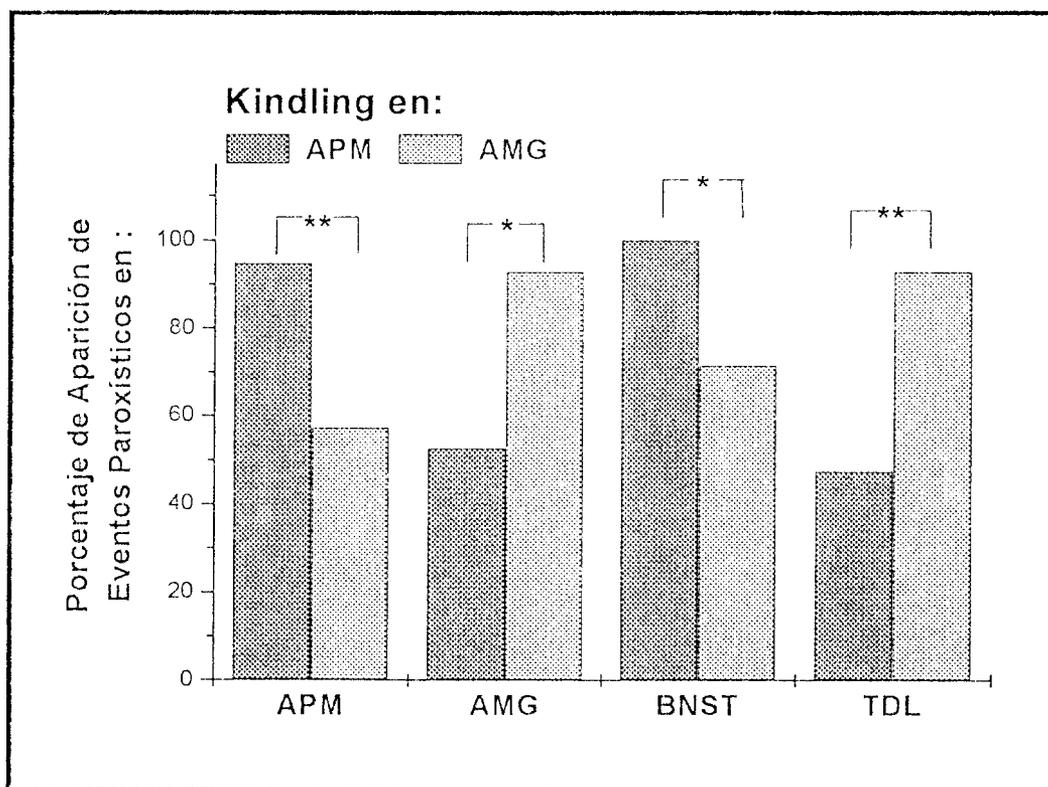


Figura 16. Porcentaje de eventos paroxísticos que aparecen en APM, AMG, NCET y TDL, cuando se estimula en el APM o en la AMG. Al ser estimulada el APM se activa sobretudo la propia APM y el NCET, y al ser estimulada la AMG el mayor porcentaje de eventos paroxísticos aparece en la propia AMG y en el TDL. Prueba χ^2 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Sin embargo, a pesar de no poder concluir de manera directa que se tratan de vías de propagación diferentes, al existir una diferencia tan marcada en la aparición de los eventos paroxísticos de las regiones registradas si se estimula el APM o la AMG, podemos concluir que tienen características diferentes y que esas diferencias pudieran explicar de manera parcial porque el kindling en la AMG no facilita la conducta heterotípica de manera tan radical como la estimulación en el APM.

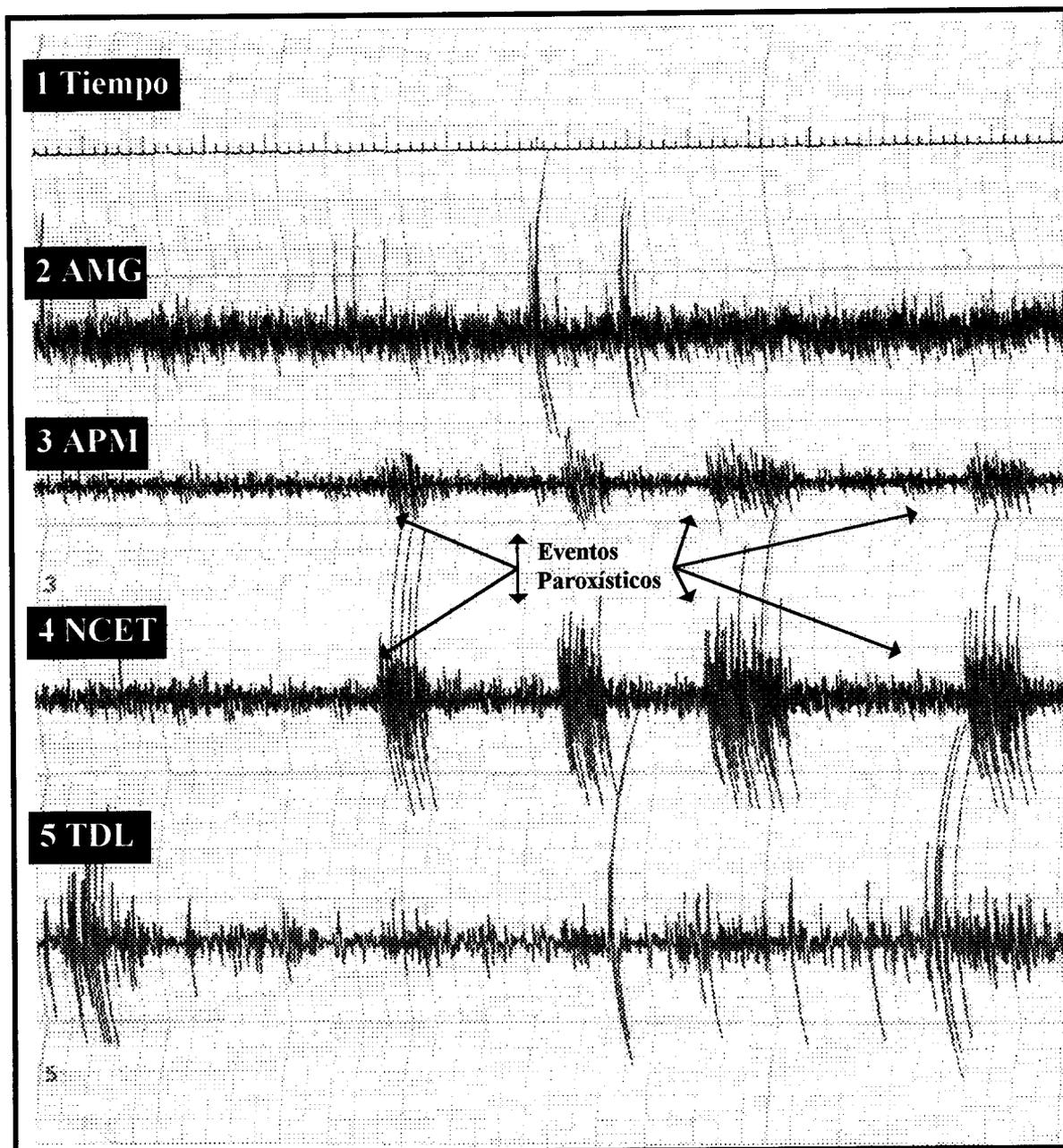


Figura 17. Registro de rata estimulada en APM. Se observan 5 canales de registro, cada uno especifica el área registrada, excepto el canal 1 el cual es de tiempo transcurrido (intervalos de 1 seg.). Obsérvese que los eventos paroxísticos después de la postdescarga aparecen simultáneamente en APM y NCET.

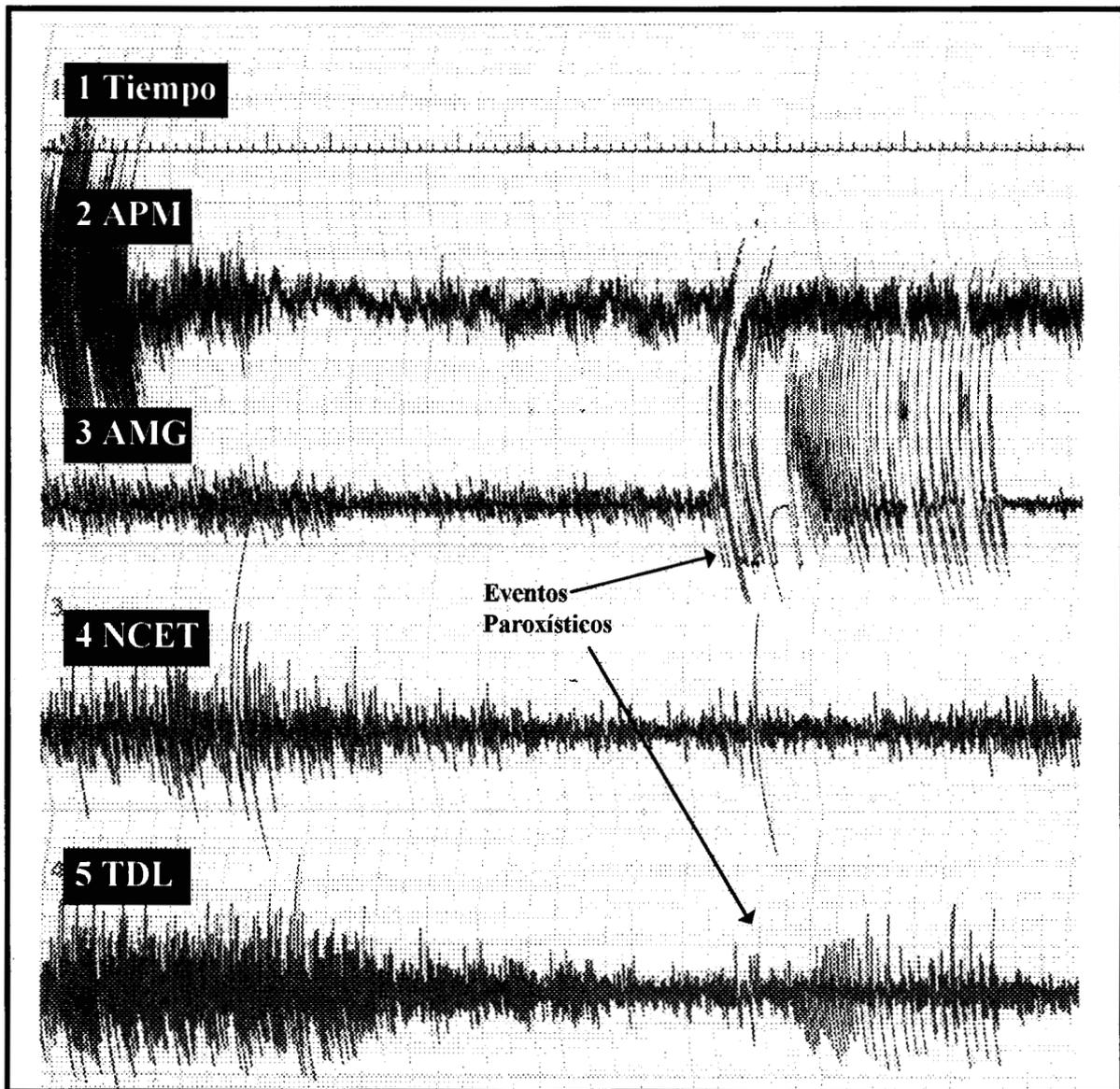


Figura 18. Registro de rata estimulada en AMG. Se observan 5 canales de registro, cada uno especifica el área registrada, excepto el canal 1 el cual es de tiempo transcurrido (intervalos de 1 seg.). Obsérvese que los eventos paroxísticos después de la postdescarga aparecen simultáneamente en AMG y TDL.

En los resultados se observa que al estimular el AMG se inducen un mayor número de eventos paroxísticos en el TDL, región que parece regular los aspectos ejecutorios de la conducta sexual masculina (Paredes y Baum, 1997), en estos animales hay un aumento del número de patrones de intromisión, un aspecto ejecutorio de la conducta sexual masculina (Beach, 1956), por lo que creemos que se trata de un efecto secundario de la estimulación de la AMG al estimularse indirectamente el TDL. Para comprobarlo decidimos inducir el kindling desde el TDL en hembras ovariectomizadas para determinar si facilitaba los

aspectos ejecutorios de la conducta sexual masculina al tratárseles con PT (experimento 4). Los resultados de este experimento no se detallan debido a que después de 15 estimulaciones no nos fue posible inducir la aparición de PD y por lo tanto decidimos que el TDL era una región totalmente refractaria para la inducción del kindling. Esto no es sorprendente debido a que ya Goddard y cols. (1969) habían encontrado que los núcleos ventrales del tegmento (cercaos al TDL) eran negativos para el kindling. A pesar de que la hipótesis no fue probada por este experimento, creemos que es una solución factible ya que incluso Paredes y su grupo (1990) encontraron que el kindling amigdalino tenía efectos sobre los parámetros ejecutorios de la conducta sexual, y como se ha mencionado, el TDL parece regular los aspectos ejecutorios de la conducta sexual. Sin embargo, el efecto del kindling amigdalino en los machos no copuladores no es tan marcado como en los estimulados en el APM. Esto puede atribuirse al hecho de que los machos no copuladores tienen sus mecanismos motivacionales depletados, y aunque se restauren o estén correctos los factores ejecutorios (Stefanick y Davidson, 1987) no se presenta la conducta sexual simplemente porque los animales no tienen la motivación para realizarla. En las hembras ovariectomizadas tratadas con PT de nuestro experimento, no es una situación similar, incluso algunas hembras SHAM tienen la motivación suficiente para presentar patrones copulatorios, por lo que si se facilitaran los mecanismos ejecutorios en estos sujetos, se vería reflejado en un aumento de la conducta sexual masculina debido a que tienen un funcionamiento eficiente, pero bajo, de los mecanismos motivacionales.

Sin embargo, es también posible que el efecto que se observa en las hembras con kindling en la AMG sea el efecto de la estimulación exclusiva de esa área. Se reconoce que la AMG también participa, aunque no de manera tan drástica como el APM o el TDL, en la regulación de la conducta sexual masculina (Giantonio, Lund y Gerall, 1970; Pierce y Nutall, 1961).

3.5 Experimento 3: Funcionamiento del sistema de proyección vomeronasal. Inmunocitoquímica contra Fos.

3.5.1 Objetivo

Evaluar la respuesta del circuito de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes en los sujetos con PD en el APM y en la AMG con 5 días de tratamiento con 2.5 mg/Kg de PT, ya que a esta dosis presentaron una facilitación del patrón de monta con respecto a los grupos SHAM, APMF5 y AMG.

3.5.2 Tratamiento

Treinta ratas hembras ovariectomizadas, fueron implantadas en el APM (n=15) y en la AMG (n=15). Se estimularon 10 ratas en el APM y 10 en el AMG, las 10 restantes se mantuvieron sin estimulación (SHAM). Después de estimular a los animales hasta la presentación de PID's en al menos 3 ocasiones, los sujetos fueron tratados con PT (2.5 mg/Kg) diariamente.

3.5.3 Exposición a claves sexualmente relevantes y perfusión

Al día cinco de tratamiento con PT, 5 animales de cada grupo (SHAM, APM y AMG) se expusieron al olor de aserrín limpio y los restantes al olor de aserrín proveniente de una caja de hembras en estro. La exposición al olor fue de 90 min. Inmediatamente después los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una sobredosis de pentobarbital. Ya anestesiados se procedió a abrir el tórax para exponer el corazón al cual se le incertó una cánula en el ventrículo izquierdo hasta la aorta y se perfundió (con una bomba Cole Parmer Mod. 7553-70) durante un minuto con 0.1 M de PBS (pH 7.4), y durante 6 min. con 4% de paraformaldehído en solución amortiguadora de fosfatos. Posteriormente se extrajo el cerebro y se colocó por una hora en 4% de paraformaldehído, y se transfirió a sacarosa (25%) en 0.1 M PBS durante al menos dos días a 4 C. Se cortó el cerebro con un microtomo de congelación en rebanadas de 35 μm que incluían secciones del bulbo olfatorio, APM, AMG anterior y posterior, NCET y acumbens. Finalmente se realizó la inmunohistoquímica para c-fos cuyo protocolo se describe en el apéndice 2.

3.5.4 Conteo de neuronas marcadas con anti-Fos

Después de montar los cortes en portaobjetos con permount (Fisher), las preparaciones se observaron en un microscopio de dibujo de campo claro y se procedió a contar en un área de 224.8 μm^2 (40x) las neuronas marcadas (inmunorreactivas) que se observaban de color café oscuro. Las regiones donde se realizó el conteo se esquematizan en la figura 19.

222871

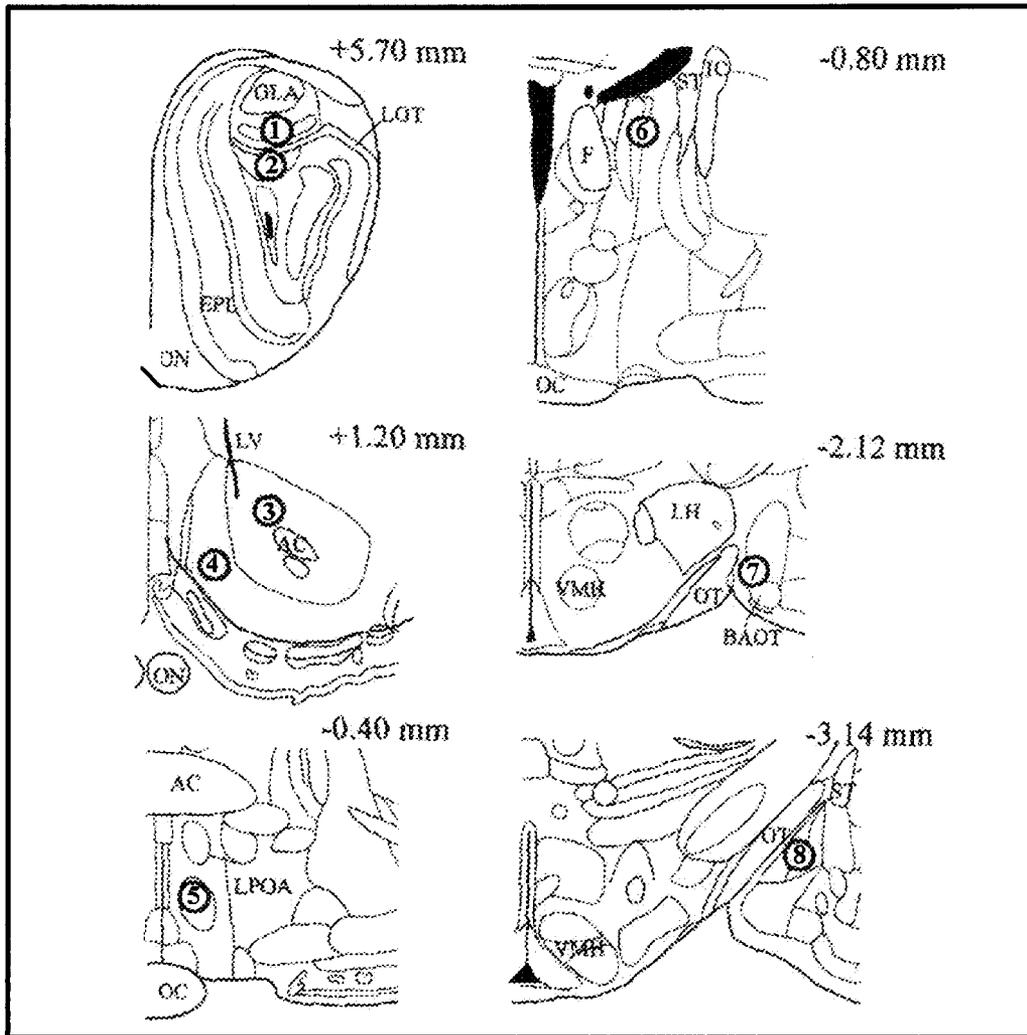


Figura 19. Diagramas esquemáticos que muestran la localización de las regiones cerebrales (círculos negros con número) en los cuales la inmunorreactividad a Fos fue contada. 1, pared de las células mitrales del bulbo olfatorio accesorio (BOA); 2, pared de las células granulares del BOA; 3, centro del núcleo acumbens (Acb); 4, cubierta del Acb; 5, área preóptica media (APM); 6, núcleo de la estria terminal (NCET); 7, amígdala medial antero-dorsal; 8, amígdala medial postero-dorsal. GLA, pared glomerular del BOA; LOT, tracto olfatorio lateral; EPI, placa plexiforme externa del bulbo olfatorio principal; PON, pared del nervio olfatorio; LV, ventrículo lateral; ON, nervio óptico; AC, comisura anterior; LPOA, área preóptica lateral; OC, quiasma óptico; IC, cápsula interna; ST, estria terminal; F, fornix; VMH, núcleo ventromedial del hipotálamo; OT, tracto óptico; LH, hipotálamo lateral; BAOT, tracto olfatorio accesorio del núcleo de la cama. La distancia (en mm) de cada sección coronal del cerebro, corresponde a partir de bregma. Adaptado de Paredes, et. al (1998).

3.5.4 Resultados

Las figuras 20-23 representan el número promedio de neuronas marcadas por el anticuerpo contra Fos en la capa granular y mitral del bulbo olfatorio accesorio (Fig. 21); en la cubierta y centro del núcleo acumbens (Fig. 23); en el APM y el NCST (Fig. 20), y en la amígdala medial anterior y posterior (Fig. 22), el ANOVA no reveló, en ningún caso, diferencias significativas entre los grupos y tampoco entre los tipos de aserrín.

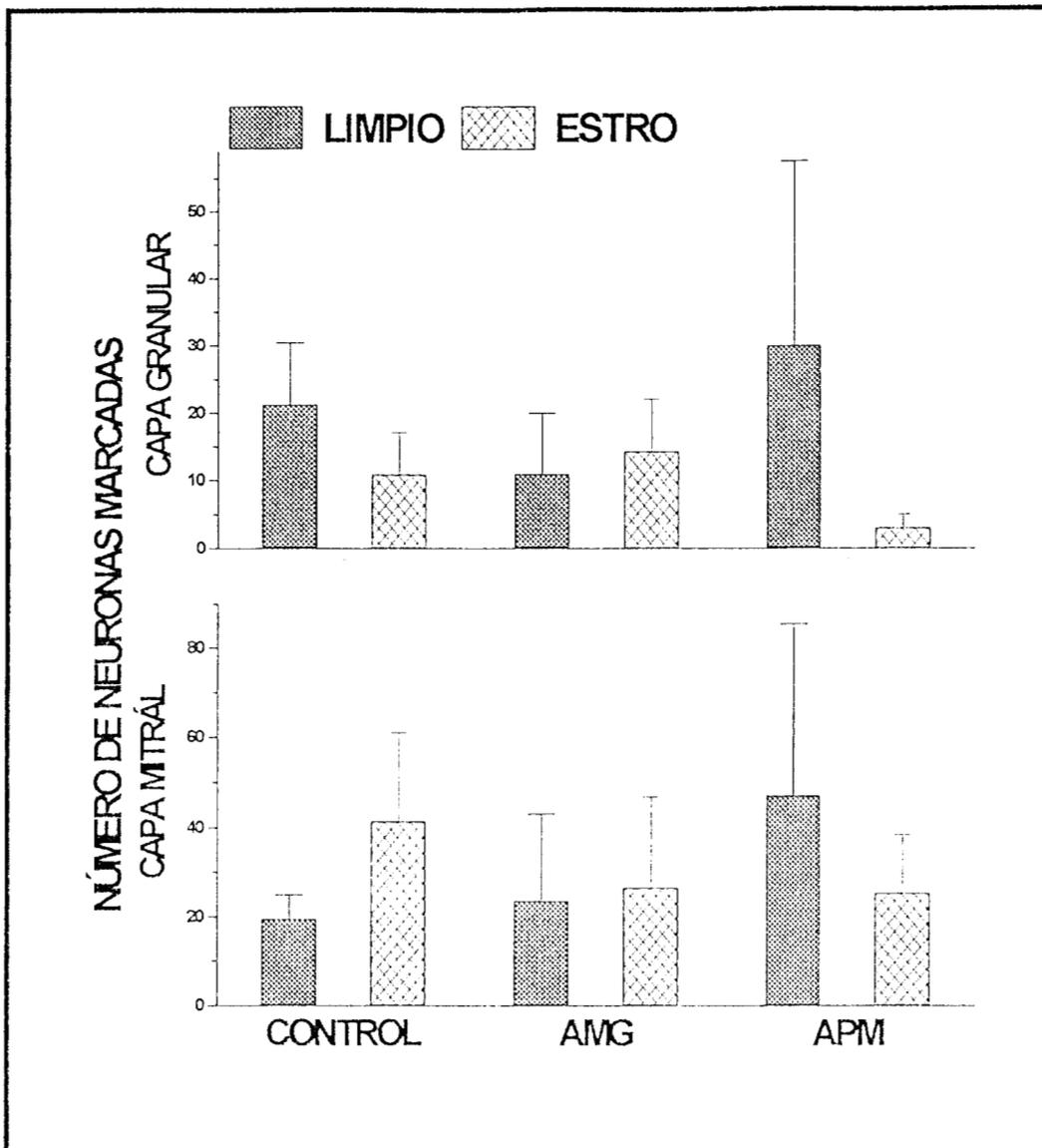


Figura 20. Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en la capa granular (arriba) y mitral (abajo) del bulbo olfatorio accesorio. Media \pm SE M.

3.5.5 Discusión

El olor de hembra en estro aumenta la inmunorreactividad a Fos en diferentes regiones cerebrales pertenecientes al circuito de proyección vomeronasal (Bressler y Baum, 1996; Oboh y cols., 1995). En machos y hembras gonadectomizados la presencia de testosterona es un factor crítico para que se manifiesten aumentos significativos de inmunorreactividad hacia Fos a lo largo del circuito de proyección vomeronasal y en la cubierta y en el centro del núcleo acumbens después de la exposición al olor de hembras en estro, estas diferencias se encuentran con al menos 10 días de tratamiento con 5 mg/Kg de PT (Paredes y cols, 1998).

En el presente experimento se administraron 2.5 mg/Kg de PT durante 5 días. Se utilizaron estos parámetros debido que a los 5 días de tratamiento con esa dosis baja se observó la facilitación del patrón de monta en los sujetos con PD en el APM (experimento 1) y creíamos que si la estimulación había disminuido la inhibición del APM, además de manifestarse en una facilitación de la conducta sexual, pudiera manifestarse en una facilitación de la respuesta del circuito de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes.

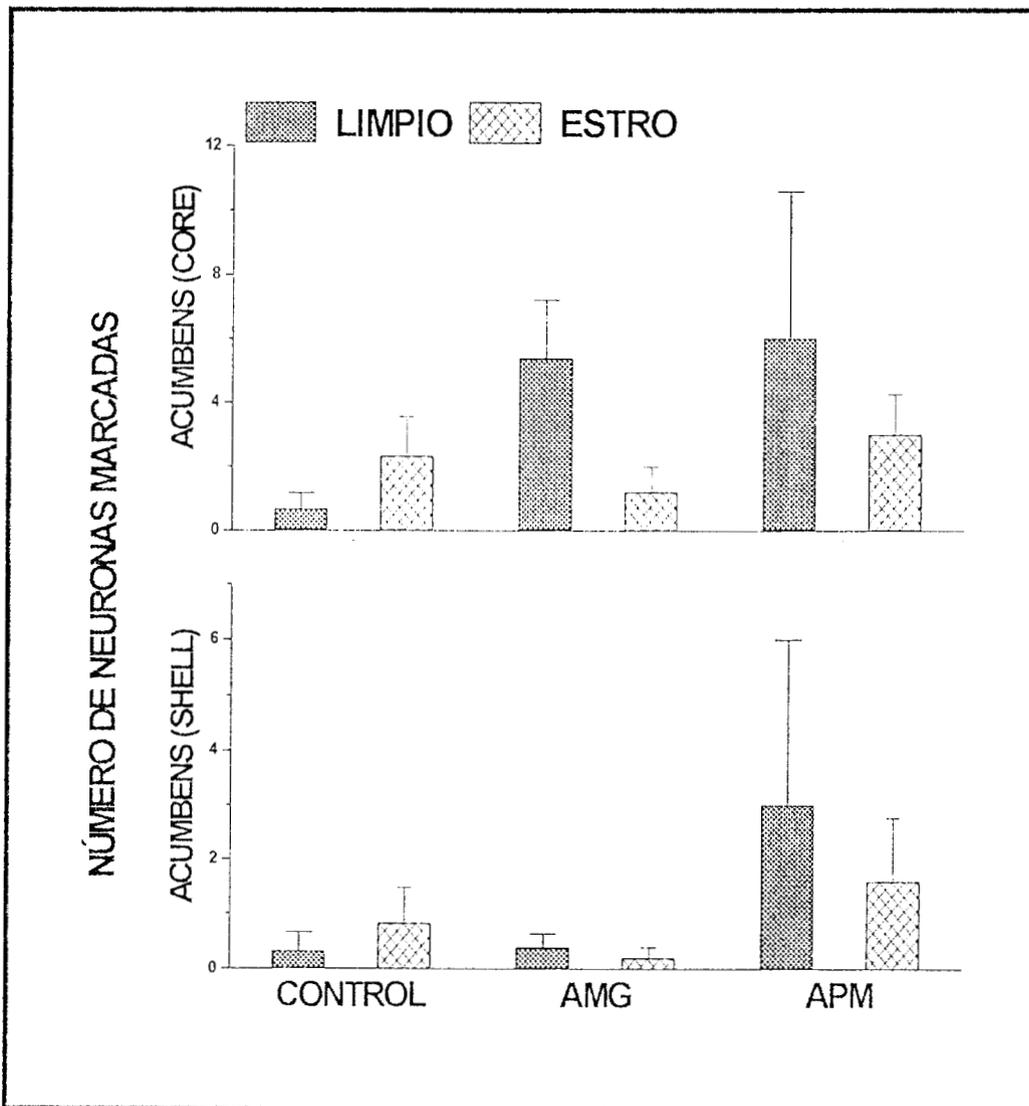


Figura 21. Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en la cubierta (arriba) y centro (abajo) del núcleo acumbens. Media \pm SE M.

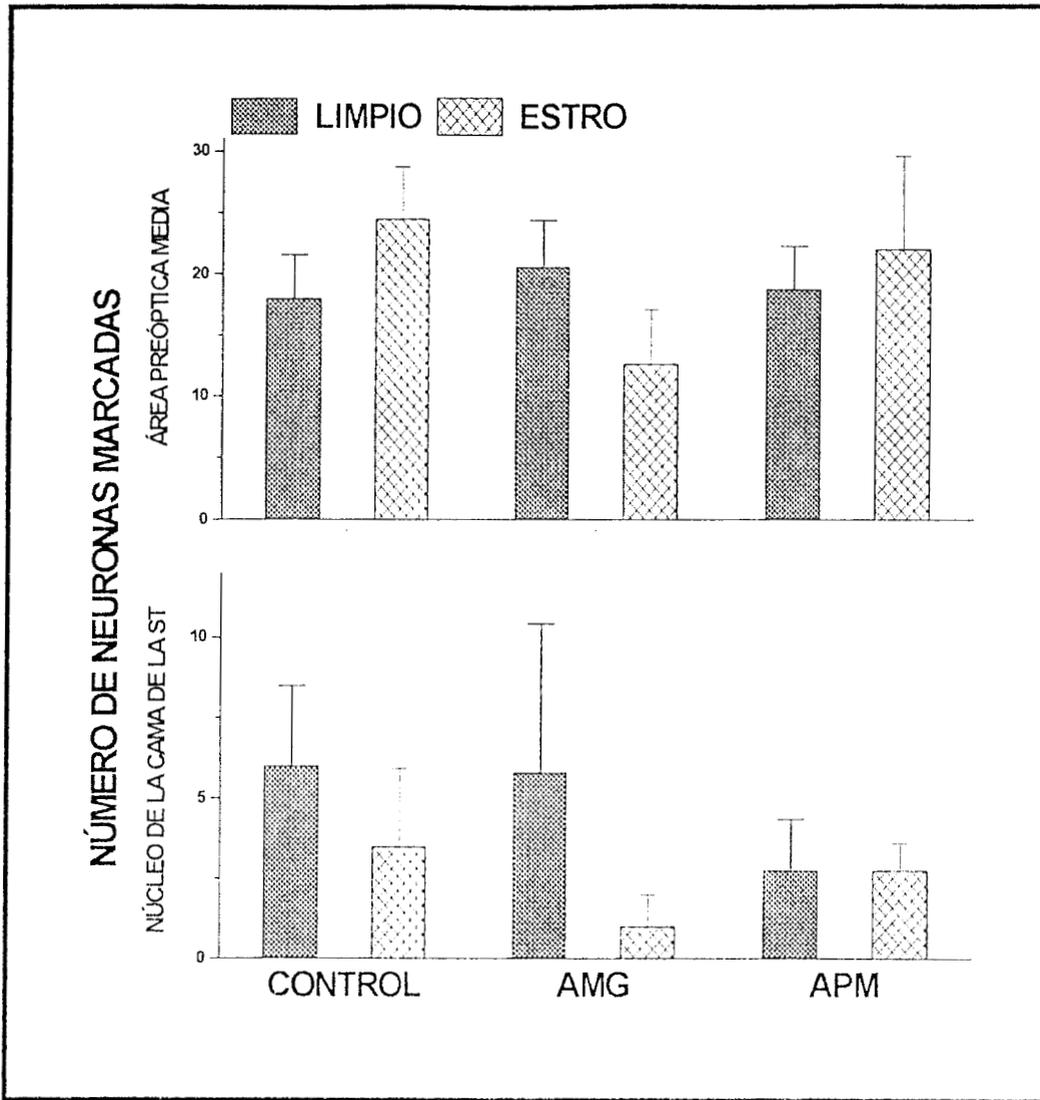


Figura 22. Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en el APM (arriba) y en el NCET (abajo). Media \pm SE M.

Por otro lado existían al menos dos maneras de ver el algún efecto de la estimulación sobre la respuesta del circuito de proyección vomeronasal. Una era que la estimulación pudiera aumentar el número de neuronas que respondieran a claves sexualmente relevantes después de un tratamiento con 5 mg/Kg de PT durante diez días, y otra, la que utilizamos, la de indagar si la estimulación provocaba una facilitación del circuito para responder a claves sexualmente relevantes que se correlacionara con el efecto facilitador de la PD observado en las pruebas de conducta. En este caso sabíamos que las hembras SHAM no responderían al tratamiento y comprobaríamos la hipótesis al observar el aumento de neuronas inmunorreactivas a Fos únicamente en los sujetos estimulados con PD en el APM. Como los resultados lo muestran ningún grupo respondió al olor de hembras en estro.

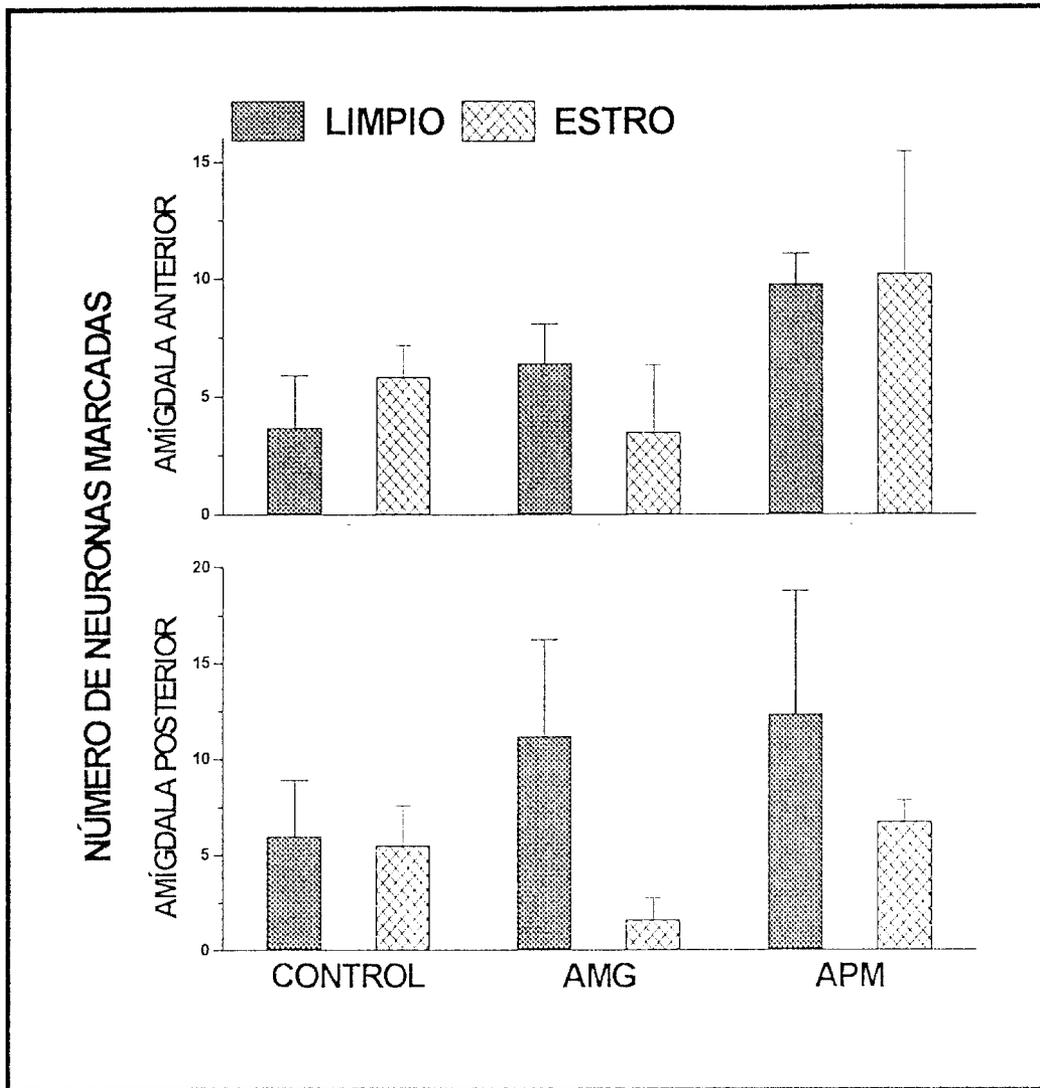


Figura 23. Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en la amígdala anterior (arriba) y posterior (abajo). Media \pm SE M.

Como mencionábamos, existían dos posibilidades para evaluar el efecto de la estimulación, con estos resultados no podemos descartar que la estimulación aumente el número de neuronas que respondan a claves sexualmente relevantes después del tratamiento tradicional con PT.

Creemos que los mecanismos por los cuales se da la facilitación de la conducta sexual masculina en las hembras con PD en el APM a los 5 días de tratamiento con la dosis baja de PT, tienen entonces que explicarse por alguna modificación exclusiva de la propia APM. Debido a que esta área participa de manera importante en el control de los componentes motivacionales de la conducta (Paredes y Baum, 1997) es probable que la presencia de PD en el APM produzca un efecto similar al de la copulación inducida por estimulación (Malsbury, 1971). En este modelo se presenta una disminución en la latencia de acercamiento a la hembra y en la latencia de monta así como una

facilitación de los mecanismos ejecutorios al momento de estimular eléctricamente el APM. Malsbury (1971) sugiere que algún tipo de sumación de la excitabilidad neural del APM provoca que al final se produzca la eyaculación en los machos estimulados. Es decir, cada monta o intromisión acerca un poco más el potencial del APM al umbral de eyaculación, cuando un número adecuado de montas e intromisiones provoca un aumento de potencial del área y alcanza el umbral, la eyaculación se produce. Malsbury (1971) sugirió que la estimulación provocaba que el umbral disminuyera y por lo tanto se necesitaría un menor número de montas e intromisiones para alcanzarlo, al presentarse la eyaculación el umbral regresaría a su “nivel normal” y una nueva estimulación eléctrica induciría una nueva disminución del umbral. Nosotros creemos que la aparición de la PD en el APM provoca una situación similar, con la gran diferencia que la aparición de la PD provocaría y mantendría un umbral menor a largo plazo como se muestra en el experimento de Paredes y su grupo (1990) y en el experimento 1 ya que en ambos experimentos se muestra una facilitación de la conducta sexual masculina tiempo después de la estimulación. Este resultado concuerda con los cambios a largo plazo que se han descrito en el kindling (ver sección 2.4). Evidentemente, la disminución del umbral que se presentaría en la hembra no podría ser de la misma magnitud que el presentado por el macho, debido a que el área neural que gobierna la conducta sexual masculina está menos desarrollado en las hembras (Baum, 1972). La disminución del umbral provocada por la aparición de la PD se daría a partir de un nivel mucho más alto que el nivel umbral que presentan los machos.

Por otro lado, se menciona que la testosterona es capaz de disminuir el umbral de eyaculación (Malsbury, 1971). Creemos que el efecto de la testosterona es más bien permisivo, es decir que su presencia es necesaria para disminuir el umbral, pero no contribuye a la disminución, ya que machos no copuladores a los que se les administra testosterona siguen sin presentar conducta sexual masculina (Portillo, 1999). Nuestros resultados nos permiten sugerir que existen al menos dos concentraciones críticas de testosterona, una que permite la aparición de patrones copulatorios (la facilitación que reportamos), y otra que permite la respuesta del circuito a claves sexualmente relevantes, no observada al no alcanzar la segunda concentración crítica.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

4.1 Discusión General

Como se mencionó en el capítulo I, se han planteado tres diferentes hipótesis para tratar de explicar el papel del APM dentro de la regulación de la conducta sexual. La primera involucran al APM en aspectos ejecutorios de la conducta sexual, la segunda la involucra en aspectos motivacionales y la tercera en ambos.

Los resultados que apoyan que el APM esta involucrado en la ejecución de la conducta sexual se pueden resumir diciendo que la lesión del APM provoca que el animal ya no copule pero sigue respondiendo instrumentalmente para obtener el acceso o compañía de una hembra receptiva (Everitt y Stacey, 1987); prefieren la compañía de una hembra receptiva o estar donde ésta estuvo (Hughes y cols., 1990); muestran interés por la hembra, se masturban y despliegan montas incompletas (Hansen y cols., 1982; Slimp y cols., 1978). Los datos que apoyan el hecho de que el APM controle los aspectos motivacionales de la conducta sexual se refieren a que los animales con lesiones en el APM muestran menor preferencia por una hembra receptiva que los animales control y esta preferencia disminuye aún más al aumentar el tiempo de prueba después de la lesión (Edwards y Einhorn, 1986), y a que la copulación asociada a la estimulación y la inducción de la conducta sexual en animales no copuladores producida por el kindling facilitan los aspectos motivacionales de la conducta sexual (Madlafousek y cols., 1970; Paredes y cols., 1990).

Finalmente los datos que apoyan que el APM participa en los mecanismos motivacionales y ejecutorios se refieren a que algunas lesiones en el APM provoca que los animales desplieguen algunas montas e intromisiones pero no alcanzan la eyaculación (Ginton y Merari, 1977), cuando se realizan cortes dorsales y sagitales de las fibras que llevan información del o hacia el APM, se producen alteraciones conductuales diferenciales relacionadas con la ejecución e inicio de la conducta respectivamente (Szechtman y cols., 1978); y a que la estimulación eléctrica (Merari y Ginton, 1975), las lesiones pequeñas en el APM (Paredes y Agmo, 1992) o la infusión de bicuculina en esta región (Fernández-Guasti y cols., 1985) reduce el número de intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio, y aumenta el número de eyaculaciones en el tiempo de prueba.

Cuando se analiza únicamente la conducta sexual, es posible discriminar si el sujeto tiene afectado el componente motivacional o ejecutorio. Beach (1956) determinó que la latencia de la

primera monta o intromisión, la latencia de eyaculación y el periodo refractario reflejaban el estado motivacional del sujeto, mientras que el número de intromisiones reflejan la capacidad ejecutoria. Él mismo postuló la existencia de un “mecanismo de despertar sexual” o umbral ejecutorio (Seward, 1956) relacionado con la motivación sexual y un mecanismo de intromisión y eyaculación (copulatorio) o umbral eyaculatorio (Seward, 1956) relacionado con la capacidad de *ejecutar* y terminar la copula.

Nuestros resultados indican que la aparición de PD en el APM disminuye la latencia de monta con la dosis baja de PT y el alcanzar la fase 5 del kindling en el APM aumenta el número de intromisiones con la dosis alta de PT. Relacionando estos resultados con lo mencionado en el párrafo anterior diríamos que la presencia de PD en el APM de hembras tratadas con la dosis baja de PT facilita el aspecto motivacional de la conducta sexual masculina al disminuir el umbral motivacional, y que las ratas hembras tratadas con la dosis alta de PT con kindling del APM de facilita los mecanismos de intromisión, es decir modifica el componente copulatorio (ejecutorio).

Por lo tanto, al estar estimulando en la misma región y obtener facilitación tanto del aspecto motivacional como del ejecutorio de la conducta sexual masculina, nos lleva a adherirnos a la hipótesis de que el APM interviene tanto en aspectos ejecutorios como motivacionales. Un conjunto de pruebas conductuales, sobretodo de preferencia y de reforzamiento sexual servirían para verificar esta aseveración. Sin embargo, en términos de conducta sexual nuestros resultados son suficientes para afirmar que el APM participa en ambos aspectos de la conducta sexual.

El hecho de que los animales no presentaran facilitación del sistema de proyección vomeronasal para responder a claves sexualmente relevantes al ser tratados con la dosis baja de PT lo atribuimos, como ya lo mencionamos en la discusión del experimento 3, a que existen diferentes umbrales de acción de la testosterona, es decir que a pesar de que la dosis baja de PT facilita el aspecto motivacional de la conducta sexual masculina en las hembras con PD en el APM, no es capaz de facilitar la respuesta del sistema de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes seguramente porque la concentración sanguínea de testosterona no alcanza el umbral de activación del circuito. Esto nos hablaría de que al menos existen tres umbrales relacionados con la conducta sexual masculina: 1) el motivacional, 2) el de ejecución y 3) el de respuesta a claves sexualmente relevantes. Generalmente uno tiende a pensar que la respuesta al olor de hembra en estro es un aspecto motivacional de la conducta, sin embargo nuestros resultados indican que son dos aspectos separados, por lo que precisamente agregamos dicho umbral. En la figura 24 se muestra un resumen de lo que se concluye de este trabajo con respecto a la conducta sexual masculina en las ratas

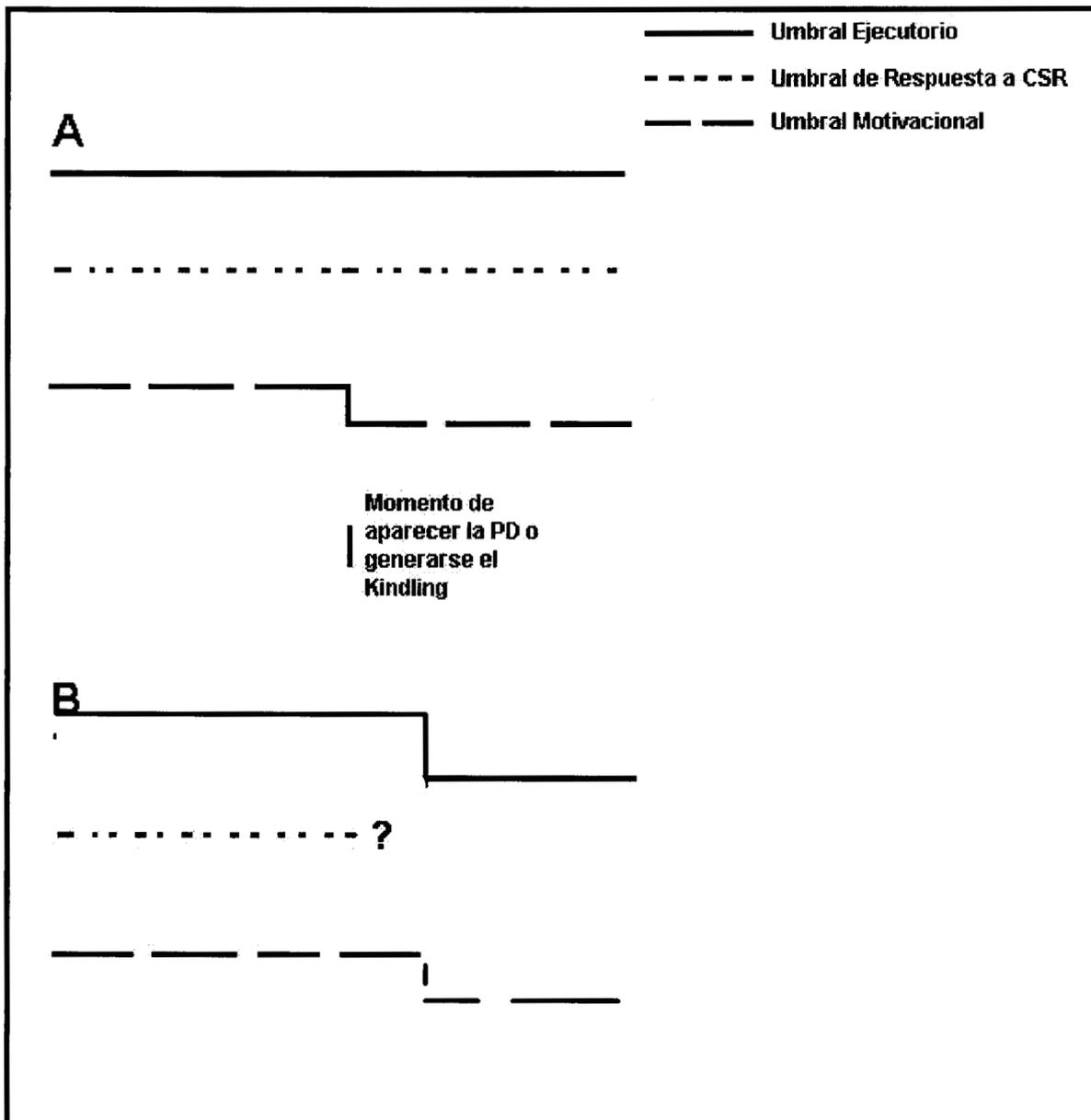


Figura 24. Hipótesis sugerida con respecto al efecto que tiene la aparición de la PD o el kindling completo sobre los umbrales que regulan la respuesta sexual masculina. (A) Postulamos que la aparición de la PD disminuye el umbral motivacional de la conducta sexual masculina en las hembras tratadas con la dosis baja de PT y no modifica los umbrales de respuesta del sistema de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes (CSR) y tampoco el umbral ejecutorio. (B) El kindling en el APM es capaz de disminuir el umbral ejecutorio de la respuesta sexual masculina con la dosis 10 mg/Kg de PT y tarda en disminuir el de manera importante el umbral motivacional en comparación a los sujetos con PD en el APM, en el presente trabajo no tenemos información para determinar que es lo que sucede con el umbral de respuesta a CSR en esta situación.

hembras estimuladas, en la parte superior (A) se postula la posible la modificación de los umbrales mencionados por la aparición de la PD en el APM, y abajo (B) lo observado en los animales con fase 5 del kindling. Ciertamente estamos conscientes que para que pueda existir la cópula debe de

presentarse alguna clave que dispare la motivación del individuo. En el caso de nuestras hembras las claves olfatorias no son las que desencadenan el proceso, o al menos no se refleja que así sea en la inmunohistoquímica. Por lo tanto creemos que en el caso de estas hembras son las claves visuales o auditivas las que despiertan la motivación y por lo tanto pueden copular.

Con respecto al experimento 2 solo nos resta agregar que se necesita un mayor número de experimentos para definir si las vías de propagación del kindling en el AMG son diferentes a las utilizadas por el kindling en el APM. Nuestros resultados sólo sugieren que al existir un patrón diferente de aparición de eventos paroxísticos entre ambas regiones, posiblemente se utilicen vías diferentes, o que si tienen vías de propagación semejantes, la característica observada (aparición diferencial de los eventos paroxísticos) pudiera explicar en parte las diferencias conductuales entre los sujetos estimulados en el APM y en la AMG.

Finalmente solo nos resta decir que la estimulación cerebral que es capaz de producir la aparición de PD, es suficiente para producir efectos dramáticos en la conducta, como se muestra en este trabajo y otros trabajos en los que la aparición de la PD es capaz de restaurar la conducta sexual masculina en machos no copuladores (Basañes, 1995) y afectar la conducta materna (Backer y cols., 1997). Probablemente al generarse únicamente la PD el efecto sea mucho más local y por tanto tendría menos efectos secundarios. Evidentemente la generalización del kindling también modifica la conducta, pero posiblemente sus efectos sean más generales. Es necesario determinar si las diferentes fases del kindling pueden generar efectos diferentes sobre la conducta, y si esas modificaciones se explican por diferentes mecanismos o si son diferentes grados de un mismo mecanismo.

222371

4.2 Conclusiones

- Establecer el kindling en el APM es difícil en comparación a establecerlo en la AMG.
 - A pesar de necesitarse un mayor número de estímulos en el APM con respecto a la AMG, el número de PD's necesarias para alcanzar la fase 5 del kindling es muy similar.
 - La duración de la PD en el APM fue muy similar a la duración de la PD en la AMG, sobretodo cuando el kindling esta establecido.
 - El APM de hembras probablemente sea más refractario al kindling que el de las ratas macho.
- **La estimulación del APM de las ratas hembras ovariectomizadas tratadas con PT, tiene efectos facilitadores sobre la expresión de la conducta sexual masculina.**
 - **La aparición de PD en el APM de ratas hembra a una dosis baja de PT (2.5 mg/Kg) facilita la expresión de patrones de monta.**
 - Probablemente los efectos facilitadores de la testosterona sobre la conducta sexual masculina en las hembras estimuladas en el APM se vieron propiciados y se mantuvieron por la presencia de PD's disminuyendo la inhibición o aumentando la conectividad de sinapsis preexistentes.
 - Sugerimos que la facilitación de la conducta heterotípica en los sujetos con PD en el APM es un proceso similar a la copulación asociada a la estimulación.
 - La aparición de la PD disminuiría en umbral de copulación a largo plazo.
 - La disminución del umbral provocada por la aparición de la PD se daría a partir de un nivel mucho más alto que el nivel umbral que presentan los machos.
 - **El tratamiento con 5 mg/Kg de PT facilita los patrones de intromisión en los sujetos con kindling en el APM.**
 - El hecho de que la facilitación se presentara tardíamente con respecto a la facilitación observada en los patrones de monta significa que los mecanismos de facilitación son diferentes.
 - Posiblemente el mecanismo involucrado en la facilitación de los patrones de intromisión tenga que ver con la formación de nuevas conexiones axonales

- **No únicamente los patrones de intromisión fueron facilitados con el kindling en el APM, sino también, aunque en menor medida, en los otros sujetos estimulados en el APM o en el AMG.**
 - Posiblemente al desarrollarse el kindling e ir reclutando un mayor número de estructuras, entre ellas el TDL, estimula indirectamente esa área lo suficiente para facilitar únicamente un mayor número de patrones de intromisión con respecto al grupo SHAM, se trataría de un efecto secundario de la estimulación de la AMG al estimularse indirectamente el TDL, ó
 - también posible que el efecto que se observa en los sujetos con kindling en la AMG sea el efecto de la estimulación exclusiva de esa área
- A pesar del aumento en dominancia que pudiera provocar el kindling, el efecto sobre la conducta sexual masculina lo atribuimos a alguna modificación propia del APM provocada por la estimulación.
- **No fue posible determinar la vía de propagación del kindling.**
- **Los eventos paroxísticos de las regiones registradas son diferentes al estimularse el APM o la AMG**
 - Al estimularse el APM aparecen sobretodo en el APM y en el NCET.
 - Al estimularse el AMG aparecen sobretodo en el AMG y en el TDL.
 - Estas diferencias pueden explicar de manera parcial porque el kindling en la AMG no facilita la conducta heterotípica de manera tan radical como la estimulación en el APM.
- **El TDL era una región totalmente refractaria para la inducción del kindling.**
- **Ningún grupo respondió al olor de hembras en estro con un tratamiento de 5 días con 2.5 mg/Kg de PT.**
 - Posiblemente existen al menos dos concentraciones críticas de testosterona,
 - una que permite la aparición de patrones copulatorios y
 - otra que permite la respuesta del circuito de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes.
- **El APM esta involucrada tanto en los aspectos motivacionales como en los ejecutorios.**

4.3 Perspectivas

- Sería importante determinar si la aparición de PD's o la generalización del kindling en el APM es capaz de aumentar la respuesta del circuito de proyección vomeronasal a claves sexualmente relevantes después de un tratamiento con 5 mg/Kg de PT durante diez días.
- Es necesario confirmar si el mecanismo por el cual se da la facilitación de la conducta se debe a una disminución de umbral motivacional o ejecutorio realizando experimentos encaminados a evaluar si las neuronas del área responden más fácilmente a estímulos subumbrales previamente determinados. Esto tiene la certeza de resultar positivo si se utilizan estímulos eléctricos dado que el kindling provoca una disminución del umbral de respuesta en el área previamente estimulada, pero valdría la pena averiguar si esta respuesta se mantiene con agonistas de neurotransmisores importantes en la regulación de la conducta sexual masculina.
- Sería interesante determinar si los efectos provocados por la estimulación eléctrica tipo kindling se debe a que se propaga a través de diferentes vías o simplemente porque el kindling provoca cambios importantes únicamente en esa región.
- Debido a que a pesar de presentarse conducta sexual masculina no se activo el circuito de proyección vomeronasal, es importante determinar que tipo de claves son las que despiertan los mecanismos motivacionales que inducen a la realización de la cópula en los animales con PD en el APM y tratados durante 5 días con 2.5 mg/Kg de PT.
- Considerar al APM como una región integradora de la conducta sexual masculina tanto de los aspectos motivacionales como ejecutorios, explicaría de manera más clara la gran cantidad de trabajos que la relacionan con uno u otro aspecto y por lo tanto llevaría a un conocimiento más claro de la regulación de la conducta sexual y del funcionamiento cerebral. Por lo tanto sería conveniente diseñar experimentos para tratar de disectar el APM y así determinar el papel que juegan las diferentes regiones del APM en la regulación de la conducta sexual.

APÉNDICE 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

PBS 0.1 M

10.2 g de fosfato de sodio dibásico, anhidro
3.85 g de de fosfato de sodio monobásico,
monohidratado
9 g de cloruro de sodio
1 L de agua destilada
NaOH 1 M hasta alcanzar un pH de 7.4

0.2 M de PB

10.2 g de fosfato de sodio dibásico, anhidro
3.85 g de de fosfato de sodio monobásico,
monohidratado
500 mL de agua destilada

PARAFORMALDEHIDO AL 4%

40 g de paraformaldehido
500 mL de agua destilada
50 mL de PB al 0.2 M

SACAROSA AL 30%

30 g de sacarosa
100 mL de PBS

TRITON AL 10%

1 mL de tritón X100
9 mL de agua destilada

PBS 0.1M CON 1 % DE AGUA

OXIGENADA

75 mL de PBS 0.1 M
2.5 mL de H₂O₂ al 30 %

ANTICUERPO PRIMARIO

(1:5000; 0.52% triton X100)
(Para 15 botes, 1.5 ml de solución por bote)
22.5 mL de PBS 0.1 M
1.17 mL de tritón al 10%
22.5 mg de azida de sodio
0.225 mL de solución stock del anticuerpo
primario (1:50 de DCH-1).

ANTICUERPO SECUNDARIO

(1:200; 0.52% triton X100)
(Para 15 botes con 1.5 de solución por bote)
22.5 mL de PBS
1.17 mL de tritón al 10%
0.113 mL de IgG anticonejo en cabra
biotenilado

PBS 0.1 M CON 0.02 % DE TRITON

2 mL de tritón al 10%
1 L de PBS 0.1 M

COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA (ABC)

(kit de Vectastain) (Preparar el ABC 30 min antes de usarse) (Para 15 botes)

30 mL de 0.1 M PBS

1.56 mL de tritón al 10% (0.52%)

6 gotas del reactivo A

6 gotas del reactivo B

DIAMINOBENCIDINA (DAB)

(Reacción de Nickel-DAB)

(Kit de sustrato de DAB para peroxidasa de Vector)

15 mL de agua destilada

4 gotas de la solución stock de bofer

8 gotas de DAB

4 gotas de peroxido de hidrogeno

4 gotas de la solución de nickel

APÉNDICE 2

INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA FOS

- 1) Lavar los cortes histológicos en 0.1 M PBS 2 veces en 10 min.
- 2) Lavar con H₂O₂ 1% en PBS 0.1 M durante 30 minutos.
- 3) Lavar en 0.1 M PBS 4 veces en 60 min.
- 4) Incubar en anticuerpo primario.

 Incubar mínimo 16 hrs a temperatura ambiente ó

 2 noches a 4 C en agitador.
- 5) Lavar con 0.02% tritón al 10% en 0.1 M PBS 4 veces en 1 hr.
- 6) Incubar en anticuerpo secundario 2 hr. A 24 C
- 7) Lavar con 0.02% de tritón al 10% en 0.1 M PBS 4 veces en 60 min.
- 8) Incubar en ABC por 90 min. A 24 C.
- 9) Lavar en PBS 4 veces en 60 min. (no usar tritón)
- 10) Reacción de Nickel-DAB

 Poner 1 mL por bote durante 6 min
- 11) Llavar 3 veces en PBS en 30 min.
- 12) Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejarlos secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Rociar los portaobjetos con agua destilada y ponerlos en un plato caliente por 40 min. Y finalmente cubrirlos con permount y colocar el cubreobjetos sin dejar burbujas.

REFERENCIAS

- Adamec, R.E. 1998. Amygdala kindling and rodent anxiety. En Corcoran, M. and Moshé, S.L. (Eds), Kindling V. Plenum Press, New York. pp. 360-378.
- Ackermann, R.F.; Chugani, H.T.; Handforth, A.; Moshé, S.; Caldecott-Hazard, S. and Engel, J, Jr. 1986. Autoradiographic studies of cerebral metabolism and blood flow in rat amygdala kindling. En J.A. Wada (Ed.), Kindling 3, Raven, New York. pp.73-87.
- Allison A. 1953. The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol Rev.* 28:195-244.
- Arendash, G.W. and Gorski, R.A. 1982. Enhancement of sexual behavior in female rats by neonatal transplantation of brain tissue from males. *Science* 217:1276-1278.
- Aronson, L.R. and Cooper, M.L. 1974. Olfactory deprivation and mating behavior in sexually experienced male cats. *Behav. Biol.* 11:459-480.
- Bakker, J.; Ophemert, J. van; Timmerman, M.; de Jong, F. and Slob, A.K. 1995. Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated rats. *Behav. Neuroendocrinol.* 396-405.
- Bakker, J. Sexual differentiation of the brain and partner preference in the male rat. 1996. Tesis doctoral. Erasmus Universiteit, Rotterdam.
- Bakker, J.; Pool, C.W.; Sonnemans, M.; van Leeuwen, F.W. and Slob, A.K. 1997. Quantitative estimation of estrogen and androgen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of neonatally estrogen-deprived male rats. *Neuroscience* 77:911-919.
- Basañes, V.A. 1995. Inducción de la conducta sexual por encendido eléctrico del área preóptica media en ratas no copuladoras: Efecto a largo plazo. Tesis de Licenciatura. Universidad Anahuac.
- Baum, J.M. 1972. Precocious mating in male rats following treatment with androgen or estrogen. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 78:356-67.
- Baum, J.M. 1992. Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. En *Behavioral Endocrinology*. Becker, J.B.; Breedlove, S.M. and Crews, D. (Eds). USA. pp. 97-139.
- Beach, F.A. 1942. Analysis of the stimuli adequate to elicit mating behavior in the sexually inexperienced male rat. *J. Comp. Psychol.* 33:163-207.
- Beach, F.A. 1956. Characteristic of masculine "sex drive". En Jones, R.M. (Ed.), *Nebraska Symposium on motivation*, University of Nebraska Press, Lincoln. pp. 1-32.
- Beach, F.A.; Noble, R.G. and Orndoff, R.K. 1969. Effects of perinatal androgen treatment on responses of male rats to gonadal hormones in adulthood. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 68:490-497.
- Beach F.A. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 7:105-138.
- Bellringer, J.F.; Pratt, H.P.M. and Keverne, E.B. 1980. Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J. Reprod. Fertil.* 59:223-228.
- Ben-Ari, Y. and Represa, A. 1990. Brief seizures episodes induced long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *T. Neurosci.* 13:312-318.
- Benjamin, R.M.; Jackson, J.C.; Golden, G.T. and West, C.H.K. 1982. Sources of olfactory inputs to opossum mediodorsal nucleus identified by horseradish peroxidase and autoradiographic methods. *J Comp. Neurol.* 207:358-368.
- Bitran, D. and Hull, E.M. 1987. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 11:365-389.
- Boast, C.A. and McIntyre, D.C. 1977. Bilateral kindled foci and inhibitory behavior in rats: a functional lesion effect. *Physiol. Behav.* 18:25-28.
- Bressler, S.C. and Baum, M.J. 1996. Sex comparison of neuronal FOS immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience.* 71:1063-1072.
- Cain, D.P. 1974. The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol. Bull.* 81:654-671.

- Cain, D.P. and Corcoran, M.E. 1985. Epileptiform effects of Met-enkephalin, β -endorphin and morphine: kindling of generalized seizures and potentiation of epileptiform effects by handling. *Brain Res.* 338:327-336.
- Cain, D.P.; Grant, S.G.N.; Saucier, D.M.; Hargreaves, E.L., and Kandel, E.R. 1995. Fyn tyrosine kinase is required for normal amygdala kindling. *Epilepsy Res.* 22:107-114.
- Caggiula, A.R.; Antelman, S.M. and Zigmond, M.S. 1974. Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat. *Physiol. Behav.* 12:313-316.
- Carrer, H.F. 1978. Mesencephalic participation in the control of sexual behavior in the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92:877-887.
- Cavazos, J.E. and Sutula, T.P. 1990. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 527:1-6.
- Chiba, T, Murata Y. 1985. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res. Bull.* 14:261-272.
- Commings, D. and Yahr, P. 1984. Lesions of the sexually dimorphic area disrupt mating and marking in male gerbils. *Brain Res. Bull.* 13:1985-1993.
- Conrad, L.C.A and Pfaff, D.W. 1976. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169:185-220.
- Corcoran, M.E. 1988. Characteristics and mechanisms of kindling. In P. Kalivas and C. Barnes, (Eds) *Sensitization of the Nervous System*, pp. 81-116.
- Croucher, M.J. and Bradford, H.F. 1990. NMDA receptor blockade inhibits glutamate induced kindling of the rats amygdala. *Brain Res.* 506:349-352.
- Dahl, M. and Dam, M. 1985. Sleep and epilepsy. *Ann. Clin. Res.* 17:235-242.
- Edwards, D.A. and Einhorn, L.C. 1986. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiol. Behav.* 37:329-335.
- Davidson, J.M. 1966. Activation of male rat's sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. *Endocrinology*, 79:783-794.
- Dennison, Z., Teskey, G.C. and Cain, D.P. 1995. Persistence of kindling: effect of partial kindling, retention interval, kindling site, and stimulation parameters. *Epilepsy Res.* 21:171-82.
- De Olmos, J.; Hardy, H. and Heimer, L. 1978. The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.* 181:213-224.
- Dudley, C.A., Rajendren, G. and Moss, R.L. 1992. Induction of fos immunoreactivity in central accessory olfactory structures of the female rat following exposure to conspecific males. *Moll. Cell. Neurosci.* 3:360-369.
- Douglas, R.M. and Goddard, G.V. 1975. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Res.* 412:318-328.
- Dudley, C.A., Rajendren, G., and Moss, R.L. 1992. Induction of fos immunoreactivity in central accessory olfactory structures of the female rat following exposure to conspecific males. *Moll. Cell. Neurosci.* 3:360-369.
- Edwards, D.A. 1974. Non-sensory involvement of the olfactory bulbs in the mediation of social behaviors. *Behav. Biol.* 11:287-302.
- Edwards, D.A. and Einhorn, L.C. 1986. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiol. Behav.* 37:329-335.
- Edwards, D.A.; Griffis, K.T. and Tardivel, C. 1990. Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner preference in male rats *Physiol Behav* 48:447-450.
- Emery, D.E. and Sachs B.D. 1975. Ejaculatory pattern in female rats without androgen treatment. *Science* 190:484-486.
- Emery, D.E. and Sachs B.D. 1976. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav.* 17:803-806.
- Erforns, P.; Bengson, J.; Kokaia, Z.; Persson, H. and Lindvall, O. 1991. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7:165-176.
- Everitt, B.J. and Stacey, P. 1987. Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II. Effects of preoptic area lesions, castration and testosterone. *J. Comp. Physiol.* 101:407-419.

- Fang, J. and Clemens, L.G. 1999. Contextual determinants of female-female mounting in laboratory rats. *Anim. Behav.* 57:545-555.
- Fernandez-Fewell, G.D., and Meredith, M. (1994). c-fos expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone stimulated male golden hamsters: Contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance *J. Neurosci.* 14:3643-3654.
- Fernández-Guardiola, A.; Tapia, R.; Brailowsky, S.; Rodríguez, R.; Luján, M.; Ramírez, R.; Medina, M.; Capistrán, C.; Calvo, J.M. and Rocha, L. 1992. Experimental models of epilepsy. *Gac. Med. Mex.* 128:443-460.
- Fernández-Guasti, A.; Larson, K. and Beyer, C. 1985. Comparison of the effects of different isomers of bicuculline infused in the preoptical area on male rat sexual behavior. *Experientia* 41:1414-1416.
- Fleming, A.; Vaccarino, F.; Tambosso, L. and Chée P. 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. *Science.* 203:372-374.
- Fletcher, I.C. and Lindsay, D.R. 1968. Sensory involvement in the mating behaviour of domestic sheep. *Anim. Behav.* 16:410-414.
- Giantonio, G.W.; Lund, N.L. and Gerall, A.A. 1970. Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73:38-46.
- Ginton, A. and Merari, A. 1977. Long range effects of MPOA lesion on mating behavior in the male rat. *Brain Res.* 120:158-163.
- Giovannelli L, Bloom FE. 1992. c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. *Neurosci. Lett.* 139:1-6.
- Goddard, G.V. 1967. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214:1020-1021.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K. 1969. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experim. Neurol.* 25:295-330.
- Goddard, G.V. and Douglas, R.M. 1975. Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory. *J. Can. Sci. Neurol.* Nov:385-394.
- Goldfoot, D.A.; Essock-Vitale, S.M.; Asa, C.; Thornton, J.E. and Leshner, A.L. 1978. Anosmia in male rhesus monkeys does not alter copulatory activity with cycling females. *Science.* 199:1095-1096.
- Gu, G. and Simerly, R.B. 1994. Hormonal regulation of opioid peptides neurons in the anteroventral periventricular nucleus. *Horm. Behav.* 28:503-511.
- Hablitz, J.J. and Langmoen, I.A. 1986. NMDA receptor antagonists reduce synaptic excitation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 6:102-106.
- Hansen, S.; Kohler, C.; Goldstein, M. and Steinbusch, H.V. 1982. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat. *Brain Res.* 239:213-232.
- Halpern, M. 1987. The organization and function of the vomeronasal system. *Ann Rev. Neurosci.* 10:325-362.
- Hard, E. and Larsson, K. 1971. Effects of mounts without intromissions upon sexual behavior in male rats. *Anim. Behav.* 16:538-540.
- Hardy, F. and DeBold, J. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 78:400-408.
- Harris, V.S. and Sachs, B.D. 1975. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res.* 86:514-518.
- Hart, B. and Haugen, C.M. 1972. Scent marking and sexual behavior maintained in anosmic dogs. *Commun Behav. Biol.* 6:131-135.
- Hart, B.L. and Leedy, M.G. 1985. Neurological bases of male sexual behavior: A comparative analysis. En: *Handbook of behavioral neurobiology*, vol. 2. Reproduction. Adler, N.; Pfaff, D.; Goy, R.W. (Eds). New York. Plenum Press, pp. 373-422.
- Heimer, L. and Larsson, K. 1966/1967. Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic anterior hypothalamic continuum, *Brain Res.* 248-263.
- Herron, C.E.; Williamson, R. and Collingrige, G.L. 1985. A selective NMDA antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 61:255-260.

- Holmes, K.H.; Bilkey, D.K.; Laverty, R. and Goddard, G.V. 1990. The N-methyl-D-aspartate antagonist aminophosphonovalerate and carboxypiperazinephosphonate retard the development and expression of kindled seizures. *Brain Res.* 506:227-235.
- Holmes, K.H.; Bilkey, D.K. and Laverty, R. 1992. The infusion of an NMDA antagonist into perirhinal cortex suppresses amygdala-kindled seizures. *Brain Res.* 587:285-290.
- Holmes, G.L.; Chronopoulos, A.; Straffstrom, A.; Mikati, M.A.; Thurber, S.J.; Hyde, P.A.; Thompson, J.L. 1993. Effects of kindling on subsequent learning, memory, behavior, and seizure susceptibility. *Dev. Brain Res.* 73:71-77.
- Hughes, A.M.; Everitt, B.J. and Herbert, J. 1990. Comparative effects of MPOA infusion of opioid peptides, lesions and castration on sexual behavior, in male rats: studies of instrumental behavior, conditioned place preference and partner preference. *Psychopharmacol.* 102:243-256.
- Hughes, P. and Dragunow, M. 1993. Muscarinic receptor-mediated induction of Fos protein in rat brain. *Neurosci. Lett.* 150:122-126.
- Hull, E.M.; Du, J.; Lorrain, D.S. and Matuszewich, L. 1997. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res. Bull.* 44:327-333.
- Ingersoll DW. 1981. Role of the vomeronasal organ in murine priming and signalling hemocommunication system. *Dissert. Abst.* 41B:3215.
- Ito, T.; Hori, M.; Yoshida, K. and Shimuzu, M. 1977. Effect of anticonvulsants on seizure developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. *European J. Pharmacol.* 45:165-171.
- Kairis, E.W.; Racine, R.J. and Smith, G.K. 1984. The development of the interictal spike during kindling in the rat. *Brain Res.* 322:101-110.
- Khurgel, M.; Racine, R.J. and Ivy, G.O. 1992. Kindling causes changes in the composition of astrocytic cytoskeleton. *Brain Res.* 592:338-342.
- King, G.L.; Dingledine, R.; Giacchino, J.L. and McNamara, J.O. 1985. Abnormal neuronal excitability in hippocampal slices from kindled rats. *J. Neurophysiol.* 54:1295-1304.
- Larsson K. 1969. Failure of gonadal and gonadotrophic hormones to compensate for an impaired sexual function in anosmic male rats. *Physiol. Behav.* 4:733-737.
- Larsson K. 1975. Sexual impairment of inexperienced male rats following pre- and postpubertal olfactory bulbectomy. *Physiol. Behav.* 14:195-199.
- Larsson, K. 1979. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In C. Beyer (Ed.) *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Raven Press, New York.
- Larsson, K. and Ahlenius, S. 1986. Masculine sexual behavior and brain monoamines. In M. Segal (Ed.) *Psychopharmacology of sexual disorders*, Libbey, London.
- Lehman, M.N. and Winans, S.S. 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res.* 240:27-41.
- Lisk, R.D. 1968. Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Experim. Brain Res.* 5:306-313.
- Löscher, W. and Ebert, U. 1996. The role of the piriform cortex in kindling. *Prog Neurobiol* 50:427-481.
- Lothman, E.W.; Hattelid, J.M.; Zorumski, C.F.; Conry, J.A.; Moon, P.F. and Perlin, J.B. 1985. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures. *Brain Res.* 360:83-91.
- Lupo, C.; Dessi-Fulgheri, F.; Musi, B. and Larsson, K. 1983. The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats. *Neurosci. Lett.* 39:261-265.
- Maiti, A. and Sneider, R.S. 1975. Cerebellar control of basal forebrain seizures: amygdala and hippocampus. *Epilepsia*, 16, 521-533.
- Madlafousek, J.; Freund, K. and Grofova, I. 1970. Variables determining the effect of electrostimulation in the lateral preoptic area on the sexual behavior of male rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 72:28-44.
- Maiti, A. and Snider, R.S. 1975. Cerebellar control of basal forebrain seizures: amygdala and hippocampus. *Epilepsia*, 16:521-533.

- Malsbury, C.W. 1971. Facilitation on male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiol. and Behav.* 7:797-805.
- Mason, C.R. and Cooper, R.M. 1972. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damage rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia*, 13:663-670 .
- McCarthy, M.M.; Davis, A.M. and Mong, J.A. 1997. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Res. Bull.* 44:487-495
- McIntyre, D.C.; Nathanson, D. and Edson, N. 1982. A new model of partial status epilepticus based on kindling. *Brain Res.* 250:53-63
- McIntyre, D.C. and Wong, R.K.S. 1986. Cellular and synaptic properties of amygdala-kindled pyriform cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 55, 1295-1307.
- McNamara, J.O. 1986. Kindling model of epilepsy. En *Advances in Neurology*. A.V. Delgado-Escueto, A.A. Ward Jr., D.M. Woodbury, A. and R.J. Porter (Eds) 44.
- McNamara, J.O. 1995. Analyses of the molecular basis of kindling development. *Psych Clin Neuros.* 49:175-178.
- Meisel, R.L.; Lumia, A.R. and Sachs, B.D. 1980. Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiol. Behav.* 25:383-387.
- Meisel, R.L.; Lumia, A.R. and Sachs, B.D. 1982. Disruption of copulatory behavior of male rats by olfactory bulbectomy at two, but not ten, days of age. *Exp. Neurol.* 77:612-624.
- Meisel, R.L. and Sachs, B.D. 1994. The physiology of male sexual behavior. En *The physiology of reproduction*. Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.) (2a ed), Raven Press, New York, pp. 3-105.
- Menella, J.A. and Moltz, H. 1988. Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. *Physiol Behav.* 42:19-28.
- Merari, A. and Ginton, A. 1975. Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in male rats. *Brain Res.* 86:97-108.
- Mikulka, P.J. and Freeman, F.G. 1984. The effect of amygdala-kindled seizures on the acquisition of taste and odor aversions. *Physiol. Behav.* 32:967-72
- Minabe, Y.; Tanii, Y.; Kadono, Y.; Tsutsumi, M. and Nakamura, I. 1986. Low-frequency kindling as a new experimental model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 94:317-23.
- Morgan, H.D.; Watchus, J.A. and Fleming, A.S. 1997. The effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal responsiveness in female rats. *Ann NY Acad Sci* 807:602-605.
- Morrell, F. 1969. Cellular pathophysiology of focal epilepsy. *Epilepsia*, 10:495-505.
- Morrell, F. 1973. Goddard's kindling phenomenon. En H.C. Sabelli (Ed.). *Chemical modulation of brain function*, Raven Press, New York. pp. 207-223.
- Morrell, F. 1985. Secondary epileptogenesis in man. *Arch. Neurol.* 42:318-335.
- Moshé, S.L. Sharpless, N.S. and Kaplan, J. 1981. Kindling in developing rats: variability of afterdischarge thresholds with age. *Brain Res.* 211:190-195.
- Moshé, S.L.; Albala, B.J.; Ackermann, R.F. and Engel, J. Jr. 1983. Increased seizure susceptibility of the immature brain. *Brain Res.* 283:81-85.
- Nadler, J. and Cuthbertson, G. 1980. Kainic acid neurotoxicity toward the hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res.* 195:47-56.
- Oboh, A.M., Paredes, R.G. and Baum, M.J. 1995. A sex comparison of increments in FOS immunoreactivity in forebrain neurons of gonadectomized, testosterone-treated rats after mounting an estrous female. *Neurobiol. Learn. Memory* 63:66-73.
- Paredes, R.; Haller, A.E.; Manero, M.C.; Alvarado, R. and Agmo, A. 1990. Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res.* 515:20-26.
- Paredes, R.G. and Agmo, A. 1992. Facilitation of sexual behavior shortly after electrolytic lesion of the medial preoptic area: what does it mean? *Brain Res. Bull.* 29:125-128.
- Paredes, R.G. and Baum, M. 1997. Role the medial preoptic area / Anterior Hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. En *Annual Review of Sexual Reserch* 7. Rosen, R.C.; Davis, C.M. and Ruppel H.J. Jr. (Eds). pp. 68-101.

- Paredes, R.G.; Tzschentke, T.; Nakach, N. 1998. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res.* 813:1-8.
- Paxinos, G. 1995. *The rat nervous system.* Academic Press London. pp:899-921.
- Peirce, J.T. and Nuttall, R.L. 1961. Duration of sexual contacts in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 54:585-587.
- Peterson, S.L.; Albertson, T.E.; Stark, L.G. 1981. Intertrial intervals and kindled seizures. *Exp. Neurol.* 71:144-153.
- Peterson, D.W.; Collins, J.F. and Bradford, H.F. 1983. The kindling amygdala of epilepsy, anticonvulsant action of aminoacid antagonists. *Brain Res.* 275:169-172.
- Pinel, J.P.J, and Rovner, L.I. 1978. Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. *Experim. Neurol.* 58:190-202.
- Portillo, W. 1999. Preferencia olfatoria y sexual en ratas machos no copuladoras y conducta sexual heterotópica en ratas hembras con kindling en el área preóptica media o amígdala. Tesis de Maestría. UNAM.
- Post, R.M. and Kopanda, R.T. 1976. Cocaine, kindling and psychosis. *Am. J. Psychiatry* 133:627.
- Post, R.M.; Kopanda, R.T. and Lee, A. 1975. Progressive Behavioral changes during chronic lidocaine administration relation-ship to kindling. *Life Science* 17:943.
- Powers, J.B. and Winans, S.S. 1975. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science.* 187:961-963.
- Price, J.L.; Russchen, F.T. and Amaral, D.G. 1987. The limbic region. II. The amygdaloid complex. En *Handbook of chemical neuroanatomy: integrated systems of the CNS.* Björklud, A. and Hökfelt, T. (Eds) Elsevier Amsterdam. pp.279-388.
- Racine, R.J. 1972a. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32:269-279.
- Racine, R.J. 1972b. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32:281-284.
- Racine, R.J.; Burhnam, W.M. and Gartner, J.G. 1973. Rates of motor seizures development in rats subjects to electrical brain stimulation: strain and interstimulus interval. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 35:553-556.
- Racine, R.J.; Newberry, F. and Burham, W.M. 1975. Post-activation potentiation and the kindling phenomenon. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 39, 261-271.
- Racine, R.J.; Rose, P.A. and Burnham, W.M. 1977. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can. J. Neurol. Sci.* 4:273-8.
- Racine, R.J. 1978. Kindling. The first decade. *Neurosurgery* 3:234-252.
- Racine, R.J. Milgram, N.W. and Hafner, S. 1983. Short (and Long)-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res.* 260:201-231.
- Racine, R.J. and Burnham, W.M. 1984. The Kindling model. En *Electrophysiology of Epilepsy.* P.A. Schwartzkroin and H. Wheal (Eds). pp 153-171.
- Racine, R.J.; Paxinos, G.; Mosher, J.M. and Kairiss, E.W. 1988. The effects of various lesions and knife-cuts on septala and amygdala kindling in the rat. *Brain Res.* 454:264-274.
- Racine, R.J.; Moore, K.A. and Evans, C. 1991. Kindling-induced potentiation in the piriform cortex. *Brain Res.* 556:218-225.
- Racine, R.J.; Adams, B.; Osehobo, P.; Milgram, N.W. and Fahnestock, M. 1998. Neuronal growth and neuronal loss in kindling epileptogenesis. En *Kindling 5.* Corcoran, M.E. and Moshé, S.L. (Eds) Raven Press, New York. pp. 193-209.
- Rainnie, D.G.; Asproдини, E.K. and Shinnick-Gallagher, P. 1992. Kindling-induced long-lasting changes in synaptic transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 67:443.454.
- Represa, A. and Ben-Ari, Y. 1992. Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Exp. Brain Res.* 92:69-78.
- Romero, P.R.; Beltramino, C.A. and Career H.F. 1990. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol. Behav.* 47:685-690.

- Roos, J.; Roos, M.; Schaeffer, C. and Aron, C. 1988. Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270:121-131.
- Russell, R.D. and Stripling, J.S. 1985. Effect of olfactory bulb kindling on evoked potentials in the piriform cortex. *Brain Res.* 361:61-69.
- Sachs, D. B. y Meisel L. R. 1988. The physiology of male sexual behavior. En: *The physiology and reproduction*, Raven Press, New York. pp. 1393-1400.
- Saito, T.R. and Moltz, H. 1986. Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* 37:507-510.
- Scalia, F. and Winans, S.S. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 161:31-56.
- Scammell, T.E.; Price, K.J. and Sagar, S.M. 1993. Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res.* 618:303-307.
- Segovia, A. and Guillamón A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev.* 18:51-74.
- Segovia, A. and Guillamón, A. 1996. Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. *Horm. Behav.* 30:618-626.
- Seward, J.P. 1956. Comments on Professor Beach's paper. En Jones, R.M. (Ed.), *Nebraska Symposium on motivation*, Univ. of Nebraska Press, Lincoln. pp. 32-38.
- Shiosaka S, Sakanaka M, Inagaki S, Senba E, Hara Y, Takatsuki K, Takagi H, Kawai Y, Thohyama M. 1983. Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways. En: *Chemical Neuroanatomy*. P.C. Emson, (Ed.), Raven Press, New York. pp359-389.
- Shiple MT, Adamek GD. 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: A study using orthograde and anterograde transport of wheatgerm agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res. Bull.* 12:221-226.
- Shouse, M.N. and Serman, M.B. 1983. 'Kindling' a seizure disorder: degree of sleep pathology predicts kindled seizure susceptibility in cats. *Brain Res.* 271:196-200.
- Silveira MCL, Sandner G, Di Scala G, Graeff FG. 1995. c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res.* 674:265-274.
- Simerly RB, Chang C, Miramatsu M, Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cell in the rat brain: on in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294:76-95.
- Simerly, R.B.; Gorski, R.A. and Swanson, L.W. 1986. Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 246:343-363.
- Simerly, R.B. and Swanson, L.W. 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: A phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270: 209-242.
- Slater, N.T. Stelzer, A. and Galvan, M. 1985. Kindling-like stimulus patterns induce epileptiform discharges in the guinea pigs in vitro hippocampus. *Neurosci. Lett.* 60:25-31.
- Slimp, J.C.; Hart, B.L. and Goy, R.W. 1978. Heterosexual, autosexual and social behavior of adult male rhesus monkeys with medial preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Brain Res.* 142:105-122.
- Slob, A.K.; De Klerk, L.W.L. and Brand, T. 1987. Homosexual and heterosexual partner preference in ovariectomized female rats: Effects of testosterone, estradiol and mating experience. *Physiol. Behav.* 41:571-576.
- Sloviter, R.S. 1991. Permanently altered hippocampal structure, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1:41-66.
- Smith, D.W and Day, T.A. 1993. Neurochemical identification of fos-positive neurons using two-colour immunoperoxidase staining. *Neurosci. Meth.* 47:73-83.
- Stefanick, M. and Davidson, J.M. 1987. Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol. Behav.* 41:439-444.
- Stelzer, A.; Slater, N.T. and Bruggencate, G. 1987. Activation of NMDA receptor blocks GABAergic inhibition in an vitro model of epilepsy. *Nature* 326:698-781.

- Stockman, E.R., Callaghan, R.S. and Baum, M.J. 1985. Effects of neonatal castration and testosterone treatment on sexual partner preference in the ferret. *Physiol. Behav.* 34:409-414.
- Stone, W.S. and Gold, P.E. 1988. Amygdala kindling effects on sleep and memory in rats. *Brain Res.* 449:135-140.
- Stumpff WE, Sar M. The olfactory system as a target organ for steroid hormones. En *Olfaction and endocrine regulation*. W. Breihpol (Ed). IRL Press London. 1982. pp. 11-21.
- Sutula, T.; Xiao-Xian, H.; Cavazos, J. and Scott, G. 1998. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239:1147-1150.
- Szechtman, H.; Caggiula, A.R. and Wolkan, D. 1978. Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain Res.* 150:569-591.
- Tanaka, T. and Nacquet, R. 1975. Kindling effect and sleep organization in cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 39:449-454.
- Tobet, S.A. and Fox, T.O. 1992. Sex differences in neuronal morphology influenced hormonally throughout life. En: Gerall, A.A., Moltz, H. and Ward, I.L. (Eds). *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol. 11: Sexual differentiation; N.Y., Plenum Press. pp. 41-83.
- Tuff, L.P.; Racine, R.J. and Adamec, R. 1983. The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat: I. Paired pulse depression. *Brain Res.* 277:79-90.
- Van Dis, H. and Larsson, K. 1971. Induction of sexual arousal in the castrated male rat by intracranial stimulation. *Physiol. Behav.* 6:85-86.
- Vasey, P.L.; Chapais, B. and Gauthier, C. 1998. Mounting interaction between female Japanese macaques: Testing the influence of dominance and aggression. *Ethology* 104:387-398.
- Vindrola, O.; Asai, M.; Zubieta, M. and Linares, G. 1983. Brain content of immunoreactive [LEU5] enkephalin and [MET5] enkephalin after pentylentetrazol-induced convulsions. *Europ. J. Pharmacol.* 90:85-89.
- Vosu, H. and Wise, R.A. 1975. Cholinergic kindling in the rat: Comparison of caudate, amygdala and hippocampus. *Behav. Biol.* 13:491-496.
- Wada, J.A., Sato, M. and Corcoran, M.E. 1974. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia* 15:465-478.
- Wada, J.A. 1978. The clinical relevance of kindling: Species, brain sites and seizure susceptibility. En *Limbic Mechanisms*. Livingston, K.E. and Hornykiewicz, O. Plenum Press, New York. pp 369-388.
- Wada J.A. and Okamoto, M. 1986. The differential role of the medial and lateral frontal cortices in amygdaloid kindling seizure in Senegalese baboons, *Papio papio*. En Wada, J.A. (Ed) *Kindling 3*, Raven Press, New York. pp. 409-426.
- Wada, J.A. (Ed) 1990. *Kindling 4*. Plenum Press: New York.
- Watanabe Y., Johnson RS., Butler LS., Binder DK., Spiegelman BM, Papaioannou VE., McNamara JO. 1996. Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J. Neurosci.* 16:3827-36.
- Wenzel BM. 1974. The olfactory system and behavior. En L. V. Di Cara (Ed.). Plenum Press. New York.
- Wersinger, S.R. and Baum, M.J. 1997. Sexually dimorphic processing of somatosensory and chemosensory inputs to forebrain luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mated ferrets. *Endocrinology* 138:1121-1129.
- Winans, S.S. and Powers, J.B. 1977. Olfactory and vomeronasal differentiation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res.* 126:325-344. 1977.
- Zaide, J. 1974. Differences between Tryon Bright and Dull rats in seizure activity evoked by amygdala stimulation. *Physiol. Behav.* 12:527-34
- Zhao, D. and Leung, L.S. 1992. Hippocampal kindling induced paired-pulse depression in the dentate gyrus and paired-pulse facilitation in CA3. *Brain Res.* 163-167.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del padrón de programas de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con Número de Registro: 309-0.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACYT, Número de Registro: 115046.