

134
Rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA
DEL BULBO OLFATORIO Y DIVERSOS
FACTORES QUE INFLUYEN EN ELLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

CELIA REYES LEGORRETA



MEXICO, D.F.,



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1995.

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a pasante(s) CELIA REYES LEGORRETA

con número de cuenta 8634414-6 con el Título: _____

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DEL BULBO OLFATORIO Y

DIVERSOS FACTORES QUE INFLUYEN EN ELLA.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DRA. EN C.	LUCIA YOLANDA	ESTRADA PALMA	
Director de Tesis	DR. EN C.	FRUCTUOSO AYALA GUERRERO	
DR. EN C.	LEON FEDERICO	CINTRA Mc. GLONE	
BIOLOGO	JAVIER RAMOS	CARVAJAL	
Suplente	M. EN C.	SERGIO CORONA GARCIA	
Suplente			



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a pasante(s) CELIA REYES LEGORRETA

con número de cuenta 8634414-6 con el Título: _____

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DEL BULBO OLFATORIO Y

DIVERSOS FACTORES QUE INFLUYEN EN ELLA.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DRA. EN C.	LUCIA YOLANDA	ESTRADA PALMA	
Director de Tesis	DR. EN C.	FRUCTUOSO AYALA GUERRERO	
DR. EN C.	LEON FEDÉRICO	CINTRA Mc. GLONE	
BIOLOGO	JAVIER RAMOS	CARVAJAL	
Suplente	M. EN C.	SERGIO CORONA GARCIA	
Suplente			

CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.

RESUMEN.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	1-13
HIPOTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y METODO.	
Condiciones previas al experimento.....	15
Determinación del estado estral.....	15-17
Cirugía para las ratas ovariectomizadas.....	17-19
Cirugía para las ratas control previo al registro electrofisiológico.....	20-22
Montaje del animal en el aparato estereo - táxico.....	23-25
Registro de la actividad eléctrica.....	26
Elaboración de electrodos.....	26-32
Perfusión.....	32-33
Histología.....	33-36
Análisis de los registros.....	36-37
RESULTADOS.....	38-55
DISCUSION.....	56-59
CONCLUSION.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	61-63

AGRADECIMIENTOS.

Para la realización de éste trabajo se contó con la participación de varias personas a las cuales deseo expresar mi agradecimiento.

En primer lugar a la Facultad de Medicina UNAM, por haberme permitido realizar los experimentos de éste trabajo en los laboratorios de Sensorial I y II del departamento de Fisiología.

A la M. en C. Dolores Aguayo del Instituto de Estudios Biomédicos UNAM quien me indicó la técnica para llevar a cabo las ovariectomías.

Al Sr. Carlos de los Santos Técnico Académico del Dep. de Fisiología de la Fac. de Medicina UNAM por su colaboración y asesoría en la elaboración de microelectrodos de registro.

A la Sra. Rebeca y Griselda Lory por su colaboración en éste trabajo.

A la Dra. en C. Silvia Galván del Instituto de estudios Biomédicos UNAM, por su ayuda en el desarrollo del análisis estadístico así como por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Dr. Manuel Salas del Instituto de Estudios Biomédicos UNAM, por haberme apoyado y permitido su laboratorio para llevar a cabo el análisis estadístico.

Agradezco infinitamente a los miembros del jurado de este trabajo: Dra. en C. Lucía Yolanda Estrada Palma, Dr. en C. Fructuoso Ayala Guerrero, Dr. en C. León Federico Cintra Mc. Glone, Biologo. Javier Ramos Carvajal y M. en C. Sergio Corona García.

Por último, quisiera hacer una mención especial, para una persona que me ha apoyado siempre, no solo en todo lo que implicó la realización de este trabajo desde el punto de vista puramente académico, sino como una excelente tutora y consejera, a la Dra. en C. Lucía Yolanda Estrada Palma.

A MIS PADRES Y HERMANOS con todo mi cariño, respeto y agradecimiento por el apoyo que he recibido durante todo este tiempo. Gracias por lo que hemos logrado.

A MIS AMIGOS por el apoyo que me brindaron durante mis estudios.

A Mirelta, Eulalio, Juan Carlos, Clementina y Mayté quienes me ayudaron y apoyaron en la elaboración de este trabajo.

RESUMEN.

Según diversos autores, el Bulbo olfatorio (B.O.) es muy importante en la conducta materna así como en el reconocimiento de las crías. También se ha demostrado la intervención del hipotálamo en la conducta materna, y en otras funciones.

Algunos autores han reportado la presencia de oxitocina en el B.O. y en el hipotálamo, haciendo notar la importancia de su intervención para desencadenar la conducta materna. Además esta conducta puede desencadenarse también por estimulación cérvico-vaginal.

El propósito del presente trabajo es comprobar si existe una coorelación entre la distensión cérvico-vaginal y la actividad del B.O. en ratas hembras vírgenes y en ovariectomizadas.

Para lo cual se hicieron registros de la actividad eléctrica del B.O. en ratas anestesiadas con hidrato de cloral. Se determinó el estado estral mediante frotis vaginal en cada caso. El registro del B.O. se hizo con micropipetas. La estimulación del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) se hizo con macroelectrodos monopolares. La estimulación cérvico-vaginal fué externa . Tanto en ratas íntegras como en ovariectomizadas se exploró el B.O. hasta localizar neuronas cuya actividad espontánea fuera evidente. Solo se estimuló NPV cuando había respuesta en B.O. a la distensión cérvico-vaginal.

Los resultados mostraron que la frecuencia de descarga de las neuronas registradas en B.O. aumenta en unas y disminuye en otras, presentándose de dos formas: 1) de una manera paulatina y 2) de una manera abrupta como respuesta a la distensión cérvico-vaginal. Estos datos son comparables a lo observado por estimulación de NPV.

Lo observado nos induce a pensar que estos comportamientos pueden deberse a: el tipo de capa del B.O. registrada y el estado hormonal de la neurona.

Todos estos datos han permitido concluir que la distensión cérvico-vaginal va a provocar un cambio sobre el nivel de actividad de las estructuras olfatorias tanto en las ratas íntegras como en las ovariectomizadas, además de presentarse diferencias en la actividad desencadenada en las diversas capas que constituyen al B.O.

Con respecto al NPV, se concluye que la estimulación eléctrica de éste cambia la actividad en el B.O. posterior a la respuesta provocada por la estimulación cérvico-vaginal.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

El sistema olfatorio es mas que un receptor de olores; también activa y sensibiliza otros sistemas neurales, mismos que constituyen sustratos para muchas respuestas emocionales y patrones conductuales. Los estímulos olfatorios provenientes del medio externo, llamados "olores familiares" tales como el olor del nido o el olor de la leche materna, son los primeros en detectarse. La captación de las ferohormonas y la aceptación de las crías hace evidente el papel que el sistema olfatorio tiene en la conservación del individuo y de la especie. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

Los centros nerviosos receptores del olfato se desarrollan muy temprano en la historia de los vertebrados (Pirlot, P. 1979). El estudio comparado en diferentes especies de mamíferos revela variaciones considerables en las vías olfatorias y sus terminaciones . En resúmen, ha habido una congregación de los centros anteriores (bulbos y lóbulos) bajo el encéfalo, así como una transferencia en dirección dorsal, hacia la corteza. Esto es evidente en los llamados animales macrosmáticos, como por ejemplo los carnívoros en los cuales el sistema olfatorio esta mas desarrollado que en los microsmáticos, como es el caso del hombre.

DESARROLLO ONTOGENICO DEL RECEPTOR OLFATORIO.

En el estudio ontogenético Cuschieri y Bannister (1975) dividieron en 5 fases el desarrollo del receptor olfatorio de los ratones:

Fase 1.-Abarca hasta el día embrionario 10, que se inicia con la formación de la placoda y predominio de 2 tipos de células, una de las cuales dará origen a los receptores y la otra, dará origen a las células de sostén.

Fase 2.- El día embrionario 11 comprende la formación de los nervios olfatorios que preceden siempre a la formación de las dendritas; en el epitelio en desarrollo, se observa la presencia de tres tipos de células.

Fase 3.-Se inicia a partir del día embrionario 12, con la formación de las dendritas,el receptor empieza a adquirir la forma de célula bipolar, los nervios olfatorios alcanzan al bulbo olfatorio (B.O.)

Fase 4.-Abarca del día embrionario 13 al 18,durante esta fase ocurre la diferenciación final del receptor y maduración de los cilios olfatorios; en esta etapa se forman las uniones comunicantes <<GAP>> y <<tight>>, entre los receptores, hay proliferación y desarrollo de las células de sostén; para que en la última fase,

Fase 5. Se alcanza la maduración de las células de sostén y la formación de las glándulas de Bowman. (día embrionario 18).

Se ha considerado que los quimiorreceptores olfatorios derivan embriológicamente de la placoda olfatoria que es de origen ectodérmico.

Las uniones de los nervios olfatorios con el bulbo olfatorio representan la integración del sentido hacia el sistema nervioso central.

Este modo de desarrollo que se observa en los vertebrados, sugiere que el sentido de la olfacción es antiguo, y que hubo la necesidad de formarse un centro sensorial en la extremidad anterior de estos animales ya que es la primera que entra en contacto con el medio que le rodea, e inclusive en la selección de sus alimentos.

DESCRIPCION ANATOMICA DEL ORGANO DE LA OLFACION.

La forma típica y primitiva del órgano de la olfacción es la de un saco situado en el extremo anterior de la cabeza y abierto por lo menos en su parte anterior.

Las funciones propiamente sensoriales del órgano están localizadas en una mucosa olfatoria denominada membrana de Schneider. Esta se encuentra formada por un neuroepitelio replegado, en el cual se localizan las células de sostén o intersticiales, que son alargadas y superpuestas a las células mucosas. Entre las demás células del epitelio se encuentran distribuidas las células sensoriales que son bipolares.(fig. 1).

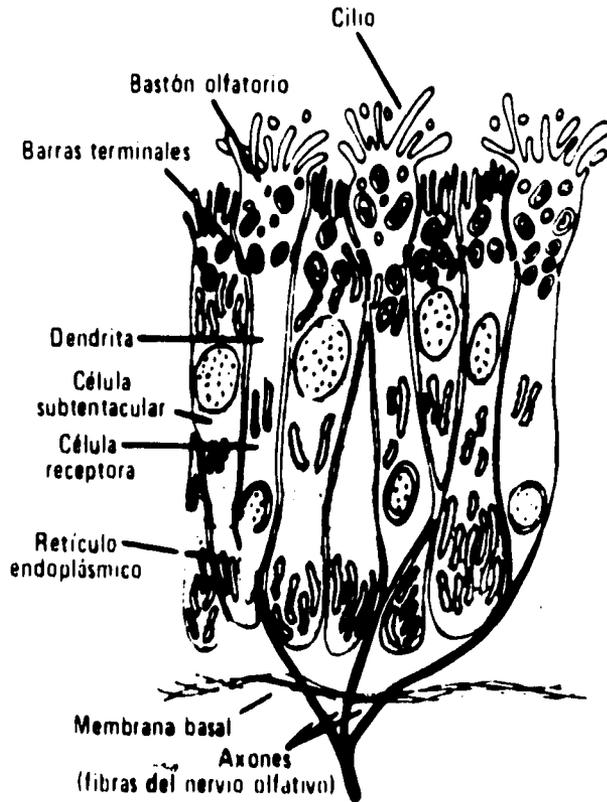


Fig. 1.- Esquema en el que se muestra la estructura y las células de la mucosa olfatoria. Tomado de Best y Taylor (1986).

En el olfato es esencial que químicamente las sustancias volátiles estén en solución para que se disuelvan y puedan ser detectadas por los receptores.

La función de los quimiorreceptores es detectar sustancias químicas, simples o compuestas, e informar a los centros nerviosos de la composición y características de dichas sustancias. (Tresguerres, 1992).

El centro de información al que conectan los receptores es el Bulbo Olfatorio, que se describe a continuación.

El bulbo olfatorio comprende dos subdivisiones, el B.O. principal y el B.O. accesorio; el primero recibe entrada de la mucosa olfatoria y el órgano septal y el último solo del órgano vomeronasal.

Las diferentes capas que conforman el B.O. de una rata adulta son: las células mitrales y las empenachadas, las que reciben la información periférica de los receptores y la transmite a las estructuras del sistema nervioso central. Dos tipos de interneuronas destacan, las periglomerulares y las granulosas; numerosas evidencias señalan a estas células como el lugar donde se ejerce la regulación centrífuga sobre el B.O. (Fig. 2).

La diferencia y el tamaño del B.O. se correlaciona con la llegada de los axones del nervio olfatorio. En experimentos de sección bilateral del B.O. se observó que,

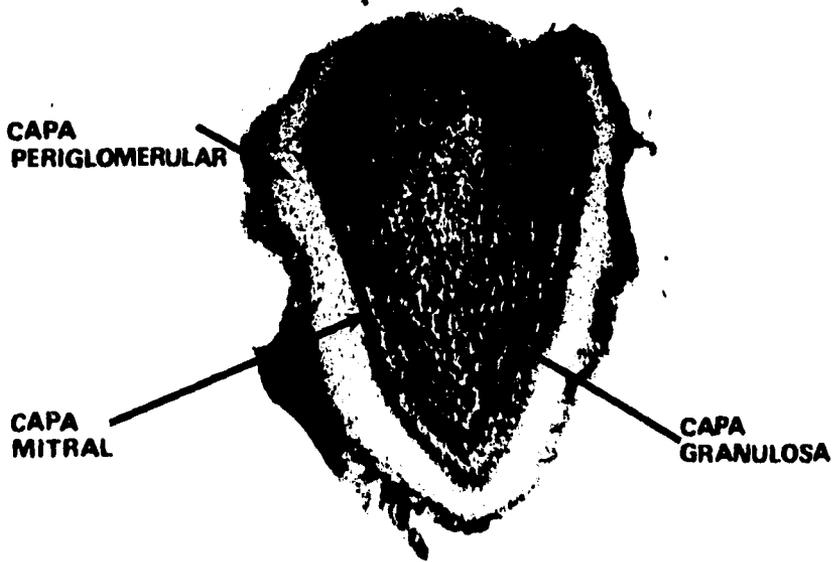


Fig. 2.- Fotomicrografía de un corte histológico del bulbo olfatorio que muestra las diferentes capas. tinción con rojo neutro.

los nervios se organizaban de tal manera, que avanzaban, penetrando hasta la neocorteza, para allí formar el glomérulo olfatorio. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991). El B.O. accesorio inicia su desarrollo mas temprano que el B.O. principal y lo culmina antes del nacimiento ya que las células mitrales son las primeras en desarrollarse. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

Un hecho interesante que se destaca en el desarrollo del B.O. es la aparición temprana de sinápsis de tipo inhibitor que se establece entre un B.O. y el contralateral. Algunos autores reconocieron la presencia de una cierta selectividad a los olores por los receptores, desde el nacimiento. (Gesteland y cols.1982).

Dentro de los neurotransmisores involucrados en la transmisión sináptica del B.O. se encuentran la dopamina, la norepinefrina, la serotonina, la acetilcolina, el ácido gamaaminobutírico, el ácido glutámico y la colecistoquinina entre otros. Algunos de estos se han localizado en capas específicas, como por ejemplo, la dopamina se localiza en la capa glomerular, donde se ubican también las células periglomerulares y las empenachadas (plexiformes) externas. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

Con el advenimiento de la técnica de la 2-desoxiglucosa, que permite traducir la actividad funcional del tejido por su consumo de glucosa, se ha podido avanzar en el conocimiento de la actividad del B.O. durante su desarrollo. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

Estudios previos han descrito las respuestas neurales en el hipotálamo lateral para los olores y para las descargas del B.O. Scott y Pfaffmann (1972), estudiaron los receptores de las neuronas hipotalámicas a diferentes tipos de olor, así como la respuesta de estas mismas neuronas al estimular eléctricamente el B.O. Las respuestas del olor solamente se encontraron en el hipotálamo en un área donde las neuronas se pueden registrar con la descarga del bulbo olfatorio y donde se pudo demostrar la presencia de axones degenerados después de lesionar la corteza olfatoria.

Se sabe bien que los olores de los alimentos son activadores poderosos de los receptores olfatorios y por otra parte la actividad del hipotálamo esta modulada por el estímulo del olor. (García-Díaz, y cols. 1984).

Por otra parte el hipotálamo proporciona la vía de salida importante a través de la cual el sistema límbico controla muchas de las funciones principales del cuerpo.

El hipotálamo es una confluencia de muchas trayectorias recíprocas de la neuropila hipotalámica entre el sistema límbico prosencefálico, el sistema límbico, mesencefálico, además de un sistema de control motor.

Las proyecciones olfatorias observadas para el

hipotálamo lateral y el área preóptica lateral usando las técnicas de la peroxidasa de rábano (HRP) confirma una interrelación cercana entre el hipotálamo y el sistema olfatorio. (Guevara-Aguilar, y cols. 1985).

En una serie de experimentos realizados (García-Díaz, y cols. 1984), se demostró que existe una entrada indirecta del tracto gastrointestinal vía nervio neumogástrico hacia el B.O. Los mismos autores demostraron que la distensión del estómago modifica la percepción de los olores asociados con la alimentación en la rata.

Existe una relación recíproca entre el B.O. y el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) el cual es modificado por la distensión del estómago, este, a su vez está implicado en la percepción de los olores relacionados con el alimento.

El Núcleo Paraventricular (NPV) juega un papel importante en la conducta de la alimentación. Se han demostrado conexiones recíprocas entre el NTS y el NPV. El dato electrofisiológico establece que el NPV tiene conexiones monosinápticas directas con el NTS. (Ortega-Villalobos, y cols. 1990).

La probabilidad de una trayectoria adicional de el NTS al B.O. vía NPV, el cual podría inhibir la información mediada del B.O. es interesante. El papel preciso del NPV en la conducta alimenticia es todavía obscuro sin embargo,

el estímulo del B.O y la distensión gástrica reducen la actividad neuronal en el NPV. (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

El núcleo paraventricular del hipotálamo es particularmente interesante. Esta estructura envía axones a neuronas: parasimpáticas vagales, simpático espinales, preganglionares, así como para las neuronas sensoriales vagales en el núcleo del tracto solitario. Por lo tanto parece ser que el núcleo paraventricular hipotalámico puede controlar la expresión de las funciones autonómicas por medio de la acción directa sobre las aferencias autónomas y sobre las neuronas sensoriales las cuales forman la rama aferente de los reflejos autónomos del tronco cerebral.

Las células del núcleo paraventricular (N.V.) y del núcleo supraóptico (S.O.) se conocen por ser las responsables de la síntesis y de la liberación de la hormona oxitocina y antidiurética (HAD), respectivamente hacia el lóbulo neural de la glándula pituitaria, estas indudablemente son las neuronas mas prominentes y fácilmente identificables en el hipotálamo. (Cross, 1968).

El núcleo paraventricular hipotalámico contiene neuronas magnocelulares a las que se les atribuye la segregación de oxitocina.

Las neuronas magnocelulares constituyen un sistema cuya organización anatómica, los productos de la secreción

así como las hormonas que son liberadas están bien definidos, estos rasgos son la razón fundamental del acercamiento básico de la mayoría de los estudios electrofisiológicos del sistema magnocelular; por otra parte, las neuronas y sus axones son accesibles a las técnicas del registro con microelectrodos y al estímulo eléctrico que permite el análisis de sus propiedades eléctricas. (Poulain y Wakerley, 1982).

Es sabido que la liberación de oxitocina ayuda al transporte de la leche desde las glándulas de la mama hasta los pezones durante la succión, y además interviene en la expulsión del feto al término de la gestación, estimulando las contracciones del músculo uterino.

Ferguson (1941) reportó que la dilatación del cervix ocasionado por el feto durante el parto inducía a la liberación de oxitocina que a su vez promueve las contracciones uterinas para expulsar el producto.

Brooks, y cols. (1966) observaron que la distensión del útero en gatas en post-partum aumenta las unidades de descarga en el NPV y evoca una respuesta a la expulsión de la leche.

Durante el reflejo de la expulsión de la leche inducida por la lactancia en la rata lactante, una proporción de las células neurosecretorias en ambos núcleos SO y PV despliegan una alta actividad eléctrica característica.

La rata lactante ofrece un modelo experimental en el cual es posible estudiar en vivo el comportamiento de las neuronas magnocelulares durante la liberación específica de la

oxitocina. (Poulain y Wakerley, 1982).

Richard (1970) observó que con la distensión vaginal en la oveja lactante ocurría en paralelo un aumento de la presión intra mamaria atribuida a la presencia de oxitocina y analizó el aumento de la actividad eléctrica registrada en el tallo pituitario.

Se ha observado un aumento en la actividad neural del NPV y en la liberación de oxitocina como respuesta a la distensión vaginal en la rata. Las aferencias uterina viajan al sistema nervioso central por el nervio hipogástrico y el pélvico en la rata. Son posibles sendas aferentes que comunican su información al canal reproductor para el NPV. (Akaishi, y cols. 1988).

Varios estudios han demostrado el papel que desempeñan los esteroides sexuales en la regulación de la liberación de oxitocina en respuesta a la distensión vaginal. (Roberts. 1971 b).

Se ha demostrado que las neuronas del NPV cambian su actividad de descarga espontánea durante el ciclo reproductivo y los cambios pueden estar correlacionados con los niveles de estrógeno y progesterona en la sangre.

Barraclough y Cross (1963) estudiaron las ratas hembras en diestro, proestro y estro encontrando evidencias cuantitativas de una respuesta diferencial de las neuronas hipotalámicas laterales en estas tres fases del ciclo sexual.

Roberts y Share (1968/1969) proponen que el tratamiento con estrógenos y progesterona modifica la respuesta de la secreción de oxitocina liberada al ocurrir la distensión vaginal. Roberts (1971 b) presentó evidencias para un sitio central de acción inhibitoria de progesterona en el cerebro; propone a la formación reticular mesencefálica como el sitio en el cual la progesterona modifica la liberación de la oxitocina, ya que es al mismo tiempo sensible a la progesterona y es crucialmente importante en la transmisión del estímulo que libera a la oxitocina.

Fahrbach, y cols. (1985) estudiaron el papel de la oxitocina endógena en el comportamiento de la rata, comprobando que es capaz de facilitar el comportamiento materno aún en las ratas vírgenes previamente tratadas con estrógenos y aunque esten ovariectomizadas.

HIPOTESIS.

Comprobar si existe una correlación entre la porción cérvico-vaginal y el propio bulbo olfatorio en ratas hembras vírgenes íntegras y en ovariectomizadas.

OBJETIVOS.

En el desarrollo de la presente tesis, los objetivos principales fueron:

1) Detectar si hay un posible cambio en la respuesta unitaria del B.O. ante la distensión cérvico-vaginal.

a) En diferente estado estral de la rata.

b) En las diferentes capas celulares del BO.

c) Ante la estimulación del NPV:

2) Observar las posibles diferencias entre ratas íntegras y ratas previamente ovariectomizadas.

MATERIAL Y METODO.

Condiciones Previas al Experimento.

Se usaron 46 ratas hembras, adultas, vírgenes de la cepa Wistar, con un peso corporal de 160-220 g. Se separaron en dos lotes: 1) ratas íntegras y 2) ratas ovariectomizadas. Se colocaron 1 ó 2 ratas en cajas de plástico de bioterio (23 X 33 x 16 cm.), se les puso una capa de aserrín, que se les cambió cada tercer día, para evitar cualquier proliferación de microorganismos.

El agua se suministró por un bebedero adecuado para este tipo de animales, el cual consistía en una botella con un tapón de plástico y un tubo de vidrio. El alimento que se administró fué en comprimidos (Purina) especial para ratas , llenando el depósito de alimento cada día (Fig. 3). El aseo de las jaulas y el cambio de agua y alimento se hizo diariamente a las 10 de la mañana.

Las ratas se mantenían en condiciones de laboratorio a una temperatura ambiente de 25 ° C en promedio, con un fotoperiodo luz-obscuridad dependiendo de la iluminación ambiental.

Determinación del estado estral.

Se determinó el estado estral de cada una de las ratas mediante frotis vaginales que se llevaron a cabo de la siguiente manera:

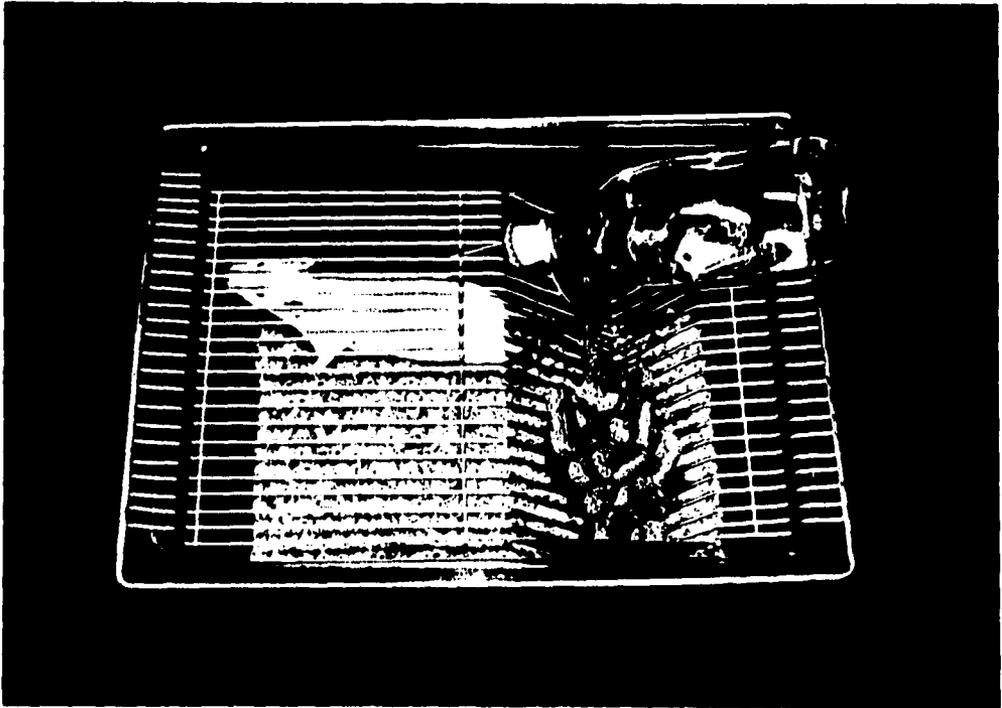


Fig. 3.-La presente fotografía muestra el mantenimiento rutinario de las ratas, en una caja conteniendo aserrín, agua y alimento en comprimido (purina).

Se tomaron muestras del exudado vaginal con una pipeta de vidrio hecha expresamente la cual contenía solución salina isotónica al 0.9 % . La muestra obtenida se colocaba en un portaobjetos, y cubierta con cubreobjetos se procedía a examinarla al microscopio. No hubo necesidad de teñirla. Este proceso se realizaba de manera rutinaria unas horas antes de efectuarse el registro de la actividad eléctrica.

Para el registro se seleccionaron aquellas ratas que se encontraron en estado de diestro-proestro, proestro, proestro-estro, o estro.

Cirugía para las ratas ovariectomizadas.

Se colocaba al animal dentro de un frasco de vidrio el cual previamente contenía una toalla de papel y un algodón impregnado de éter con el cual se anestesiaba.

La razón por la que se utilizó éter como anestésico fué porque esta cirugía no requiere de una anestesia de larga duración, además el éter es un anestésico volátil que permite una rápida recuperación.

La rata ya anestesiada se sacaba del frasco y se rasuraba de los costados, donde se llevaría a cabo la cirugía.

El animal se colocaba en una mesa previamente preparada con lo necesario para llevarse a cabo la cirugía

como es: tijeras, pinzas, agua, algodón, hilo esterilizados, caja de petri con solución salina, y merthiolate para desinfectar la lesión.

Se procedió a cortar la piel y separarla, para posteriormente, cortar el músculo y extraer el ovario mediante la técnica sugerida por la Maestra Dolores Aguayo. (Fig. 4).

Con un pedazo de hilo esterilizado se amarraban las trompas de Falopio y se cortaba el ovario, éste se colocaba en una caja con solución salina para examinarlo y verificar si estaba íntegro. Ya realizada la extracción se procedía a suturar al animal.

Se limpiaba la herida con mertiolate para evitar infecciones y se colocaba a la rata en una caja con las condiciones de higiene antes mencionadas debajo de una lámpara para proporcionar calor al animal, además alimento y agua ad libitum.

Al cabo de 24 hrs. el animal ya recuperado de la anestesia y de la operación se mantenía bajo un fotoperiodo luz-obscuridad dependiendo del medio ambiente, así como la temperatura que era aproximadamente de 25 ° C y se le mantenía en estas condiciones durante 8 o 10 días para su recuperación total y sin alteraciones de su organismo para poder utilizarlas posteriormente para el registro electrofisiológico.



Fig. 4.- Fotografía que muestra el momento en que se lleva a cabo una ovariectomía. La técnica que se siguió fue la indicada por la Maestra Dolores Aguayo del Instituto de Estudios Biomédicos UNAM.

Cirugía para las ratas control previo al registro electrofisiológico.

La rata se anestesiaba con una inyección aplicada intraperitonealmente de una solución de hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal). (Fig. 5).

Se seleccionó éste, por ser un anestésico disociativo que no deprime tanto la actividad neuronal, como ocurre con otros.

En todos los casos se anotó la hora en la que se aplicó la primera anestesia, así como la dosis aplicada y se valoró periódicamente el grado de anestesia observando los reflejos pupilares y flexores.

La rata se rasuró para quitar el exceso de pelo de la región en la que se realizó la cirugía.

Se montó al animal en un aparato estereotáxico de Horsley y Clark, el cual sirve para fijar la cabeza de la rata y así se pudo lesionar, estimular, y registrar la actividad eléctrica en los sitios precisos y con base en las coordenadas indicadas en el atlas. (Fig. 6).

El electrocardiograma (EKG) en el animal se monitoreó siempre utilizando alfileres de seguridad metálicos los cuales se insertaron en la piel a nivel torácico, sirviendo como electrodos de registro.



Fig.5.- En la presente fotografía se muestra la manera rutinaria para anestésiar a la rata intraperitonealmente con una solución de hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal).

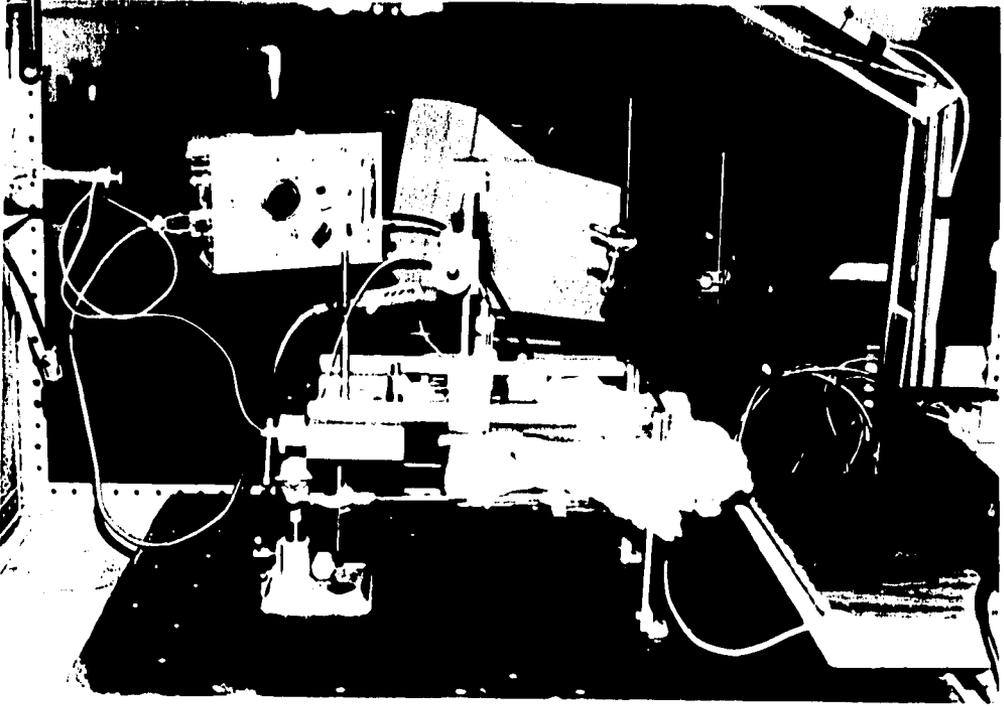


Fig.6.- En la presente fotografía se muestra el aparato estereotáxico de Horsley y Clark, incluyendo una torre micromanipuladora.

Montaje del animal en el aparato estereotáxico.

Se verificó que los "lápices aurales" estuvieran en el armazón, fijando uno de ellos firmemente del lado opuesto al que se este maniobrando. Se introduce el lápiz que se encuentra fijo, en el orificio de la oreja del animal, posteriormente se fija el otro extremo, y se verifica que ambos lápices se encuentren centrados y que el animal no tenga movimiento hacia los lados.

Para evitar movimientos de la cabeza en sentido vertical, se sujeta el hocico y la región nasal con la placa que se encuentra al centro del estereotáxico. (Fig. 7).

Con el bisturí se hizo una incisión longitudinal en la piel y se expuso el hueso del cráneo, (Fig. 8) se identificó la línea media y las suturas bregma y lambda, las cuales se colocaron en el mismo plano con ayuda de la torre de calibración. Se selecciona el área deseada de acuerdo a las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1982) y se marca con un lápiz sobre el cráneo mismo del animal.

Con un Moto-Tool Dremer de 115 volt, 0.9 AMP, Modelo 280 (el cual, tiene una fresa de dentista), se hacen los trepanos en el punto seleccionado dejando expuesto el tejido cerebral. Para mantener el tejido en condiciones óptimas, se cubre con aceite mineral. Todo se hizo siempre con el animal anestesiado.

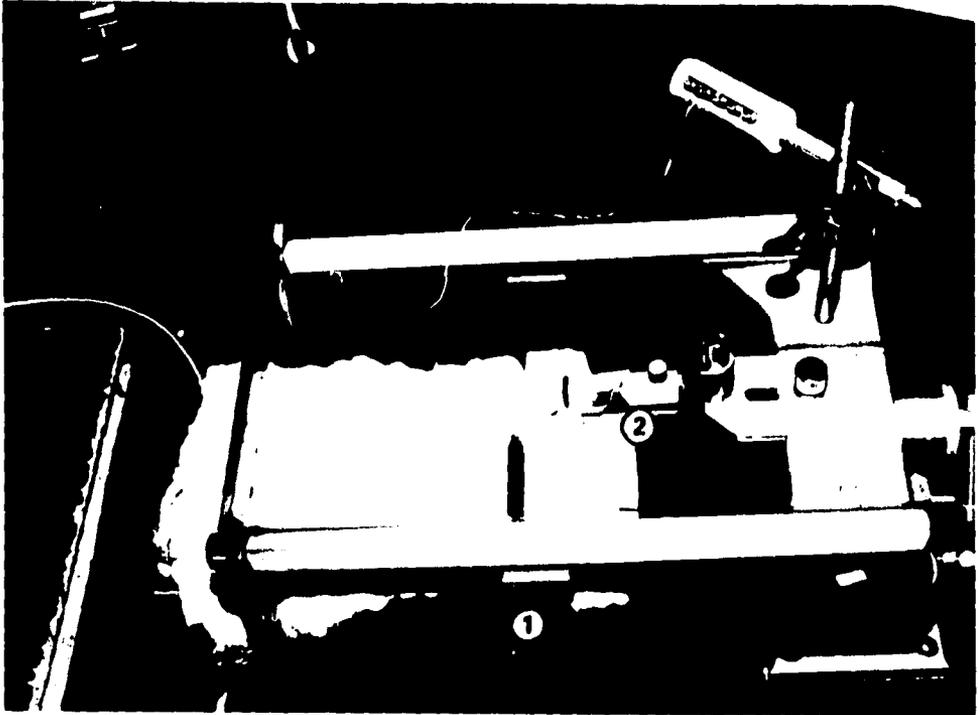


Fig.7.- Se observa el aparato de Horsley y Clark, para la colocación del animal anestesiado. Con números se señala: 1)lápices aurales, evitan el movimiento de la cabeza hacia los lados; 2)placa central que evita el movimiento de la cabeza en sentido vertical.



Fig.8.- Fotografía de una rata ya colocada en el aparato de Horsley y Clark. Se observa la incisión longitudinal en la piel de la cabeza exponiéndose el hueso del craneo del animal. Todo se hizo con el animal sometido a anestesia general.

Registro de la actividad eléctrica.

El registro del B.O. se hizo con micropipetas de vidrio cuya resistencia siempre se media y se seleccionaban aquellas que dieran un valor de 7 a 15 megohms. Se les colocaba un alambre de plata alemana en su interior para usarlos como electrodos de registro.

Elaboración de electrodos.

Se utilizó un estirador de pipetas marca Narishige, se calibró a un magneto de 3 unidades y un calentamiento de 5 unidades para que se tuviera un intervalo de 15 amperes.

Se fija el tubo capilar a los cabezales del "taladro" en ambos extremos y se presiona el botón de arranque (START), obteniendo 2 pipetas cada vez. (Fig.9).

Posteriormente se rompe la punta de la micropipeta con una placa metálica ayudándose de un microscopio. (Fig.10).

Para llenar la micropipeta se utilizó una aguja Ksrpool No.27 (ortodoncia) soldada a una aguja Hipodérmica. (Fig. 11).

La solución a usar para el llenado de la micropipeta en este caso fue Azul de Pontamina que se preparó de la siguiente manera:

Azul de Pontamina: 20 ml Acetato de Sodio 0.5 M.

200 ml Azul de Pontamina.

20 ml Agua Destilada.

(Filtrar 3 veces).

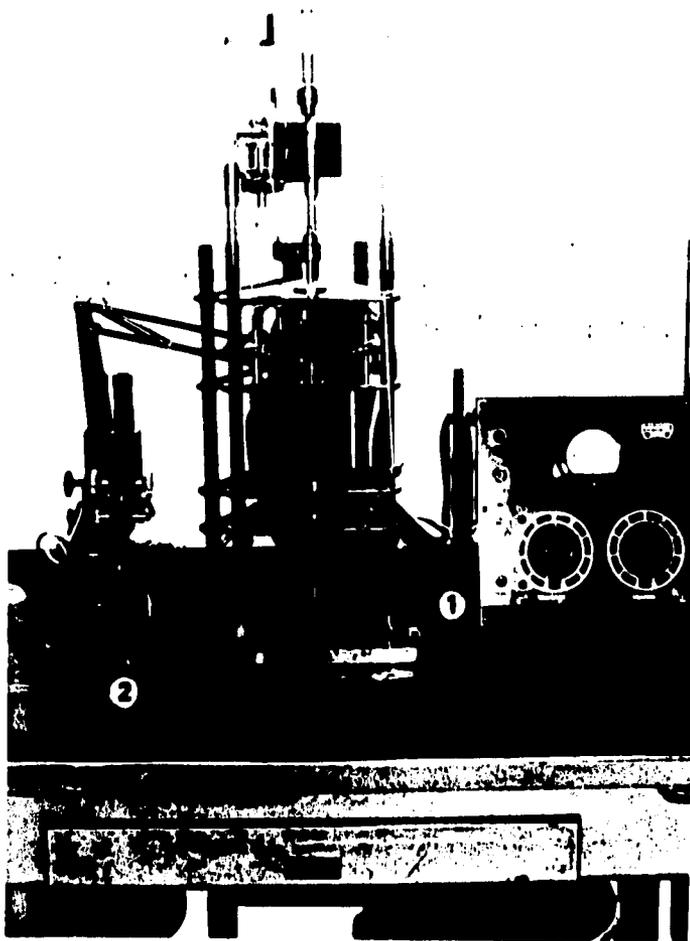


Fig.9.- Fotografía que presenta: 1)estirador de pipetas; 2)microscopio conocular micrométrico para medir la punta de la pipeta.

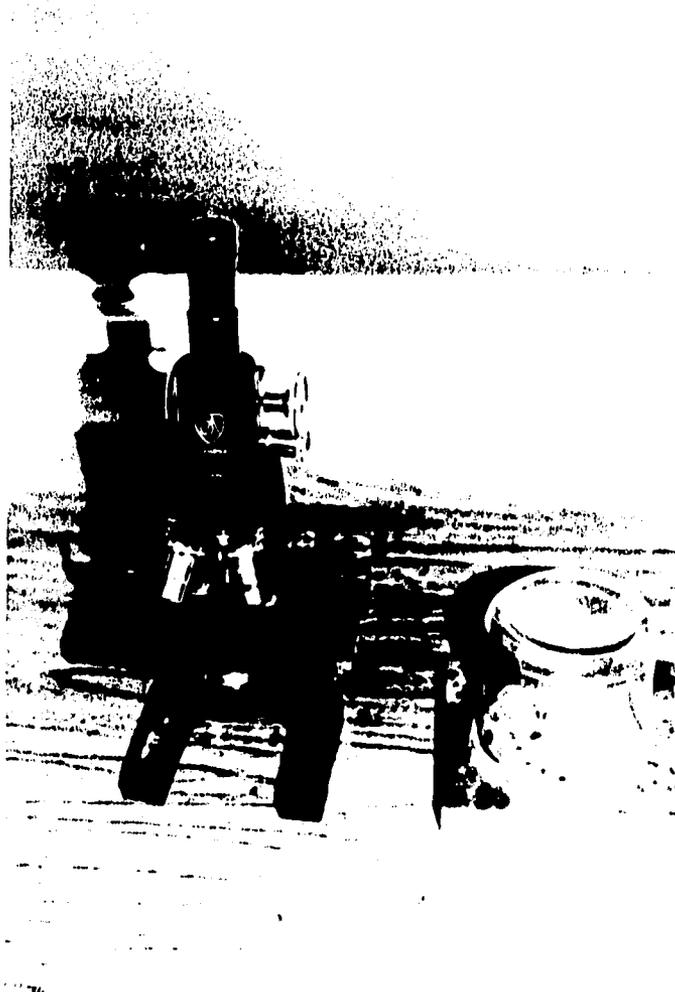


Fig.10.-Microscopio y placa metálica con la cual se rompen las puntas de las pipetas (izquierda). Recipiente para proteger y colocar las pipetas (derecha).



Fig.11.-Fotografía que muestra cómo se llevó a cabo el llenado de la micropipeta, con azul de pontamina.
Detalle de una aguja krspool No. 27 soldada a una aguja hipodérmica. (Facilitada por el Sr. Carlos de los Santos, Técnico Académico de Fisiología, Fac. de Medicina UNAM).

La micropipeta se pone en la torre y se coloca de acuerdo a las siguientes coordenadas: Anterior (A) = 7.0 a 8.0 por delante de Bregma; Lateral (L), a la línea media 0.5 a 1.0 y de Profundidad (H) tomando en cuenta desde la superficie (B.O) 1.0 a 3.0. (Fig. 12).

Para estimular al núcleo para ventricular hipotalámico se utilizó un macroelectrodo bipolar fabricado con un tubo de acero inoxidable No.23, se metió al interior del tubo un Nicrom calibre 32 aislado con barniz a una temperatura de 150 ° C , con una resistencia de 200 a 250 kilohms.

El electrodo se colocó en una segunda "torre" de acuerdo a las siguientes coordenadas: Posterior (P) = 1.5; L = 0.0 línea media; H = 8.0 de la superficie (NPV).

Para estimular se aplicaron pulsos cuya intensidad era de 0.5 a 10 miliamperes y de 4 seg. de duración.

La estimulación cervico-vaginal fue externa, por distensión con una sonda de Foley utilizando un Inyector Compact, Modelo No.975. (Fig.12).

La sonda de Foley, consiste en un tubo de polietileno que se colocaba por uno de sus extremos a una jeringa de 5 cm con 3 cm de agua, el otro extremo se sujetaba con un hilo y la punta se eliminaba para poder insuflarlo, se introducía por el esfínter externo de la vagina.

Mediante este sistema se inyectaba 1 ml de agua destilada y se sostenía distendido durante 1 min al final

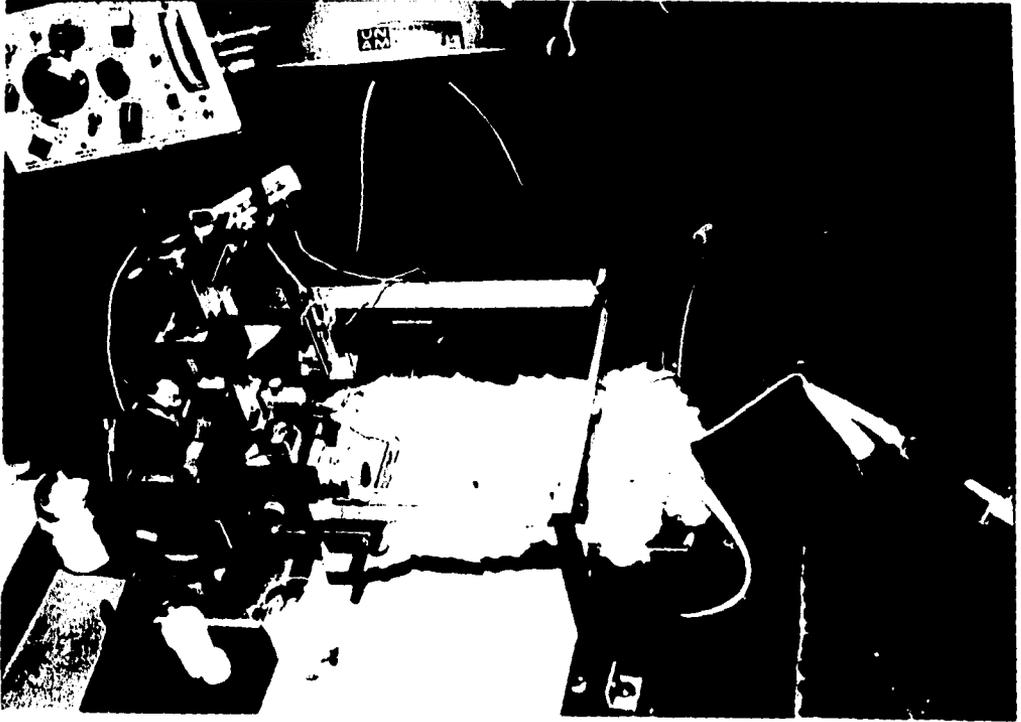


Fig.12.-Se observa al animal "montado" en el aparato estereotáxico, la micropipeta es sostenida por la torre e introducida en el cerebro del animal. Para la estimulación cérvico-vaginal se utiliza una sonda de Foley y un inyector (a la derecha).

del cual cesaba la distensión.

Con el microelectrodo se exploraba el B.O. hasta localizar aquellas neuronas cuya actividad espontánea fuera evidente y constante.

Sólo se estimuló NPV cuando había respuesta en B.O. a la distensión cervico-vaginal.

Se amplificaron los potenciales obtenidos en B.O. con ayuda de un preamplificador marca Grass modelo P-16 por su valor de impedancia, y la señal se proyectó en un osciloscopio, conectado a una grabadora que permitió que se almacenara la información en una cinta magnética.

Al término del registro se marcaron tanto la unidad registrada en el B.O. como la estimulada en el NPV, para lo cual se paso una corriente de 25 miliamperes durante 4 min. para inyectar el azul de pontamina en el caso del B.O. y de 6 miliamperes durante 3 s para el NPV y posteriormente se marcaba con una solución saturada de ferrocianuro de potasio.

Perfusión.

Se sacrificaron a los animales por medio de una sobredosis de la misma anestesia y se procedió a perfundir al animal de la siguiente manera:

Se descubrió el corazón y se canalizó en el ventrículo izquierdo, con unas tijeras finas se cortó el ventrículo derecho, se perfundió con 150 ml de una solución salina

fisiológica al 0.9 % . La solución se tenía en un frasco a 1.5m de altura para que la solución corriera por gravedad. En seguida se perfundió con 150 ml de formol al 10 % hasta observar que cesaran los efectos que se producen como son, contracciones musculares en todo el cuerpo y rigidez que indicaban una buena perfusión.

La solución de formol al 10 % estaba saturada con ferrocianuro de potasio, para que se depositara en la región del NPV al que se pasó corriente directa a través del electrodo, dejando una mancha de color azul.

Se cortó la cabeza del animal y se colocó en un frasco con formol al 10 % por un tiempo mínimo de 24 hrs. para asegurar la fijación.

Posteriormente se extrajo cuidadosamente el cerebro, colocándolo en un frasco con formol al 10 % hasta el momento de hacer los cortes histológicos.

Histología.

Se lavó el cerebro entero durante 3 ó 5 min. en agua de la llave, para lavar el exceso de ferrocianuro.

Se seleccionó únicamente el área deseada de todo el tejido cerebral, o sea el B.O. y el área que comprendía al NPV.

Se colocó el tejido en un microtomo por congelación marca Leica, modelo KRYOSTAT 1720 el cual se graduó a -15°C

durante 15 min, dando el tiempo suficiente para que se congelara el tejido de manera uniforme, el criostato permitía también el enfriamiento de la cuchilla.

Se graduó el criostato para que se obtuvieran cortes de 40 micras.

Los cortes se depositaban cuidadosamente conforme se obtenían en un recipiente con solución salina isotónica, o directamente en los portaobjetos en el caso del B.O. impidiendo su deterioro por manipulación.

Se procedió a montar los cortes en los portaobjetos, los cuales previamente se impregnaron con una capa de gelatina que sirve para que el tejido se adhiera evitando perderlos al tratarlos con la técnica de tinción.

Posteriormente los portaobjetos conteniendo los cortes se colocaron inclinados sobre un trozo de papel filtro, para escurrir los residuos de agua. Ya secas las laminillas se tiñeron de la siguiente manera:

Los cortes del B.O. se tiñeron con rojo neutro y los de NPV con Violeta de Cresilo, siguiendo las técnicas de tinción.

Preparación de la solución de rojo neutro.

Acetato Buffer pH 4.8 _____ 40 ml.

Rojo Neutro al 1 % _____ 1 litro.

Acetato Buffer pH 4.8.

Acido Acético 0.1 N _____ 500 ml.

Acetato de Sodio 0.1 N _____ 750 ml

Tren de tinción y deshidratación para el rojo neutro.

1 lavado en agua destilada.

1 " " alcohol al 70 %

1 " " " " 95 %

2 " " " " 100 %

2 " " " " Xileno.

Preparación de la solución de violeta de cresilo.

Violeta de Cresilo_____3 g.

Agua Destilada_____80 cc.

Alcohol Etílico_____20 cc.

Oxalato de Amonio_____0.8 g.

Se disolvió primero el violeta de cresilo en el alcohol y luego se agregó el oxalato de amonio y el agua destilada.

Tren de tinción y deshidratación para el violeta de cresilo.

2 lavados en Agua Destilada.

2 " " alcohol al 96 %

2 " " " absoluto.

1 " " alcohol-xilol (1/2 alcohol absoluto, 1/2 xilol).

2 " " xilol.

Al concluir la fase de tinción y deshidratación se pusieron unas gotitas de resina sintética y se montó el cubreobjetos.

Se verificó el punto exacto del registro y los sitios del estímulo al NPV microscópicamente, con ayuda del Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos y Watson. (1982).

Análisis de los registros:

Las señales en la cinta magnética se introdujeron en una ventana discriminatoria de la marca Winston Electrónica, modelo RAD-11-a. De esta manera los potenciales podían ser discriminados con base en su amplitud, seleccionando los de mayor intensidad. Los potenciales así seleccionados fueron transportados a un convertidor digital-analógico a una computadora (Denki Corona modelo No.975.). Los datos así procesados se obtuvieron en un histograma de frecuencia, los cuales se graficaron por medio de un inscriptor Hewlett Packard modelo 7470A. Este programa se llamó "Espiga" y fué elaborado por el Maestro Arturo Aldana (Fig. 13).

Los datos obtenidos de los histogramas de frecuencia en coorrelación con la histología se analizaron estadísticamente con el método discriminatorio canónico utilizando el paquete estadístico SISTAT (Ver. 2.1). facilitado por el Dr.Salas del Instituto de Estudios Biomédicos. UNAM.

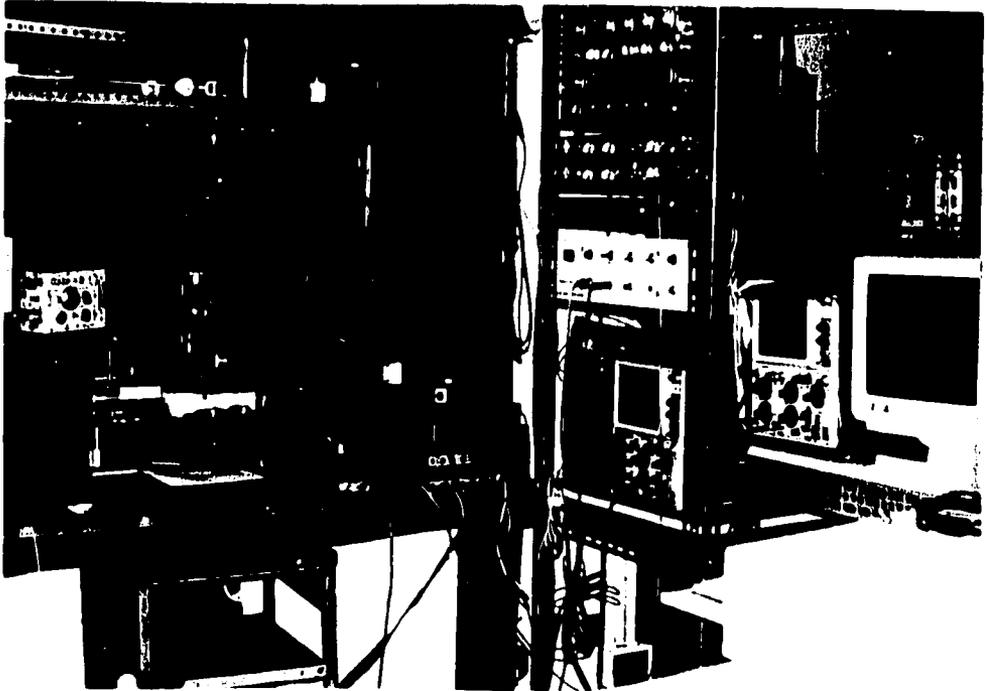


Fig.13.-Fotografía que presenta un aspecto en conjunto de todo el sistema de registro, facilitado por el Depto. de Fisiología de la Fac. de Medicina UNAM.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Se registraron los potenciales en el B.O. en respuesta al estímulo cérvico-vaginal de 46 animales, de éstos, 23 se utilizaron como grupo control y los 23 restantes como grupo experimental (animales ovariectomizados).

Los resultados en el grupo control mostraron (Cuadro 1) efectos de diferentes frecuencias en las 23 neuronas registradas en el B.O. con relación al estímulo dado. 14 de las 23 neuronas exhibieron una disminución en la actividad (Graf. 1) y 9 aumentaron la actividad (Graf. 2) con respecto a la frecuencia inicial.

La histología ayudó a localizar la situación del electrodo de registro, por la marca de azul de pontamina en los sitios en donde se obtuvo respuesta en el B.O. (Fig.14). Se tomó como referencia el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982). La Fig.14 se basa en el atlas de Burton (1980), en donde se pueden ver las diferentes capas. Los números indican los sitios de algunas neuronas registradas.

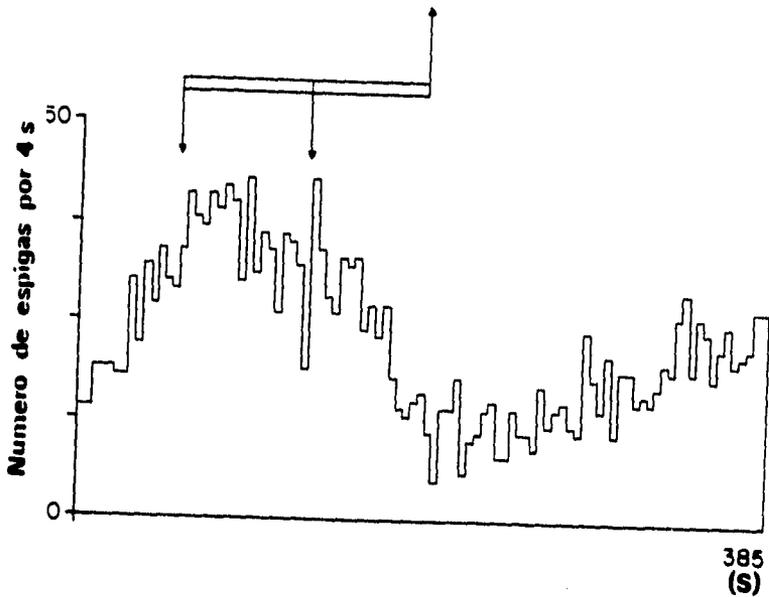
El que se tuvieran registros en las diferentes capas del B.O. nos permitió observar que la actividad en la frecuencia de las neuronas varía.

De los 23 animales registrados (Cuadro 1) 7 neuronas

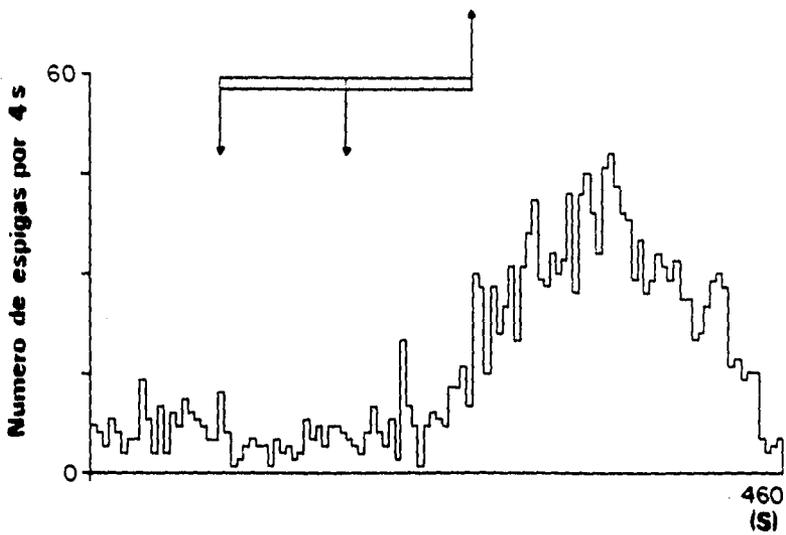
GRUPO CONTROL

FASE	PESO CORPORAL (g)	COORDENADAS HISTOLOGICAS			LOCALIZACION DE LA PIPETA	EFECTO POR DISTENSION EN LA FRECUENCIA	DISTENSION INICIAL Y RESPUESTA	REBOTE	RECUPERACION DE LA FRECUENCIA INICIAL	CESO LA FREC.
		ANTERIOR	LATERAL	PROFUNDIDAD (μ)						
PROESTRO	204	7.2	1	154	GLOMERULAR	DISMINUYE	154	-	228.8	SI
PROESTRO	204	7.2	1	154	GLOMERULAR	DISMINUYE	172	-	136.4	NO
PROESTRO	169	7.8	1	290	GLOMERULAR	AUMENTA	115.2	-	94	NO
PROESTRO	169	7.8	1	290	GLOMERULAR	AUMENTA	115.2	-	86.4	NO
PROESTRO	194	8	0.7	780	PLEXIFORME-EXT	AUMENTA	157	147.5	42.5	NO
DIESTRO-PROESTRO	205	8	1	753	GLOMERULAR Y PLEXIFORME-EXT	AUMENTA	133	99	19	SI
DIESTRO-PROESTRO	199	7.8	1	1,756	ENTRE PLEXIFORME EXT. E INT.	AUMENTA	177.6	136.8	38.4	NO
PROESTRO-ESTRO	198	7.5	1	586	PLEXIFORME EXT. Y MITRAL	DISMINUYE	270	-	28	NO
PROESTRO-ESTRO	166	6	0.45	560	GLOMERULAR	AUMENTA	120.4	-	185	SI
PROESTRO-ESTRO	166	6	0.45	560	GLOMERULAR	AUMENTA	129	-	189.2	SI
PROESTRO	174	7.05	1.62	741	PLEXIFORME-EXT. Y MITRAL	DISMINUYE	208	-	16	NO
PROESTRO-ESTRO	160	6.5	0.5	788	GLOMERULAR	DISMINUYE	508.2	-	117.6	NO
PROESTRO-ESTRO	198	7	0.6	1,628	GRANULOSA	DISMINUYE	330	-	80	SI
PROESTRO-ESTRO	198	7	0.5	1,628	GRANULOSA	DISMINUYE	215	-	60	SI
ESTRO	178	7	1	665	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	114	-	36	NO
PROESTRO-ESTRO	215	7.2	1	1,840	GRANULOSA	DISMINUYE	336	-	105.6	NO
PROESTRO-ESTRO	159	7.8	0.7	1,171	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	369.6	-	145.2	NO
ESTRO	210	8.2	1	675	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	190	-	64.6	NO
ESTRO	178	7.45	0.51	2,045	GRANULOSA	DISMINUYE	332.5	-	47.5	SI
PROESTRO-ESTRO	220	8.6	0.41	772	GLOMERULAR Y PLEXIFORME-EXT	DISMINUYE	220.8	-	59.8	SI
PROESTRO	210	7.85	1.5	2,314	GRANULOSA	DISMINUYE	169	-	72	SI
PROESTRO-ESTRO	206	7.45	0.4	1,799	GRANULOSA	DISMINUYE	163.2	-	19.2	NO
DIESTRO-PROESTRO	200	8	0.7	3,697	MITRAL	DISMINUYE	250.3	-	100	NO

Cuadro 1.- Grupo Control. Ratas Integras. En el presente cuadro se muestra la frecuencia de las neuronas registradas, así como su ubicación histológica, la localización de la pipeta en las diferentes capas del bulbo olfatorio, el peso y el estrado estral del animal.



Graf. 1.-Muestra la frecuencia de descarga del B.O. ante la distensión cérvico-vaginal. La primera flecha en dirección descendente señala el inicio de la distensión, la segunda el momento en que se alcanzó 1 ml en la sonda. La tercera flecha que es ascendente marca el cese de la distensión. Nótese el decremento en la frecuencia de la neurona que se localizó en la capa glomerular.



Graf. 2 .- Se observa que al cesar la distensión, lentamente se va incrementando la frecuencia de descarga de la neurona localizada en la capa mitral-plexiforme interna.

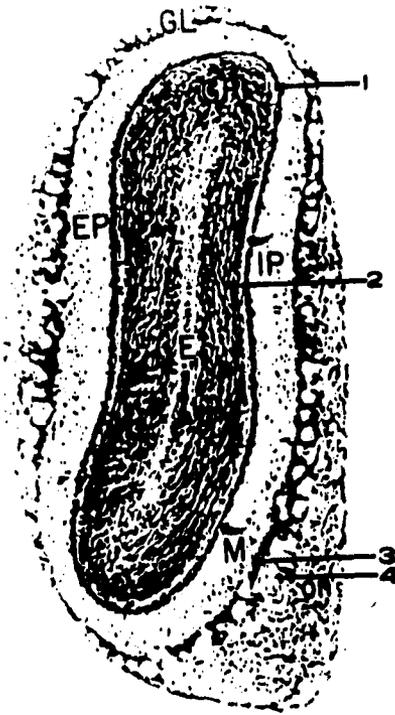


Fig. 14.-Esquema que muestra las diferentes capas que conforman el bulbo olfatorio; E = ependimal, EP = plexiforme externa, GL = glomerular, IP= plexiforme interna, M = mitral, on = nervio olfatorio.

registradas se localizaron en la capa glomerular de las cuales, 3 de ellas disminuyeron su actividad mientras que las 4 restantes la aumentaron. 10 neuronas que se registraron en las capas plexiforme-mitral-plexiforme mostraron que 5 de éstas aumentaron su actividad y 5 la disminuyeron. En la capa granular se registraron 6 neuronas las cuales todas presentaron una disminución en la actividad ante el efecto de la distensión cérvico-vaginal.

Se observó que las neuronas en las diferentes capas tienen diferente actividad pero que además, la respuesta que se presenta puede ser de dos maneras, de forma abrupta (Graf. 3) o de una manera paulatina (Graf. 4). independientemente de que aumente o disminuya la actividad.

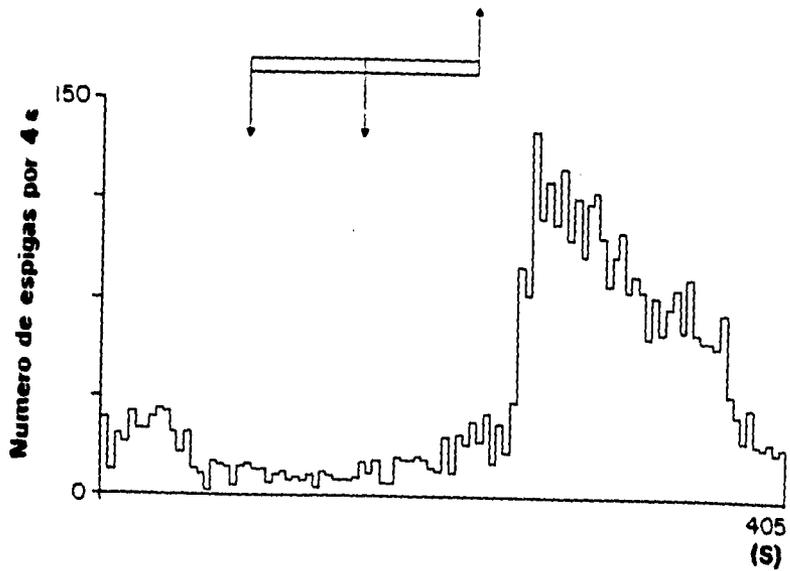
En relación al segundo grupo (animales ovariectomizados) se obtuvo que de los 23 animales (Cuadro 2) 17 presentan una disminución en la actividad de la frecuencia mientras que 6 aumentan su actividad.

Con respecto a la actividad en las diferentes capas (Cuadro 2) se observó que en la capa glomerular se registraron 5 neuronas las cuales presentaron una disminución en la actividad. 13 de las neuronas se encontraron en las capas plexiforme-mitral-plexiforme de las cuales 8 disminuyen su actividad y 5 la aumentaron, en la capa granulosa se registraron 5 de las cuales 4 disminuyeron su actividad mientras que una de ellas la aumentó.

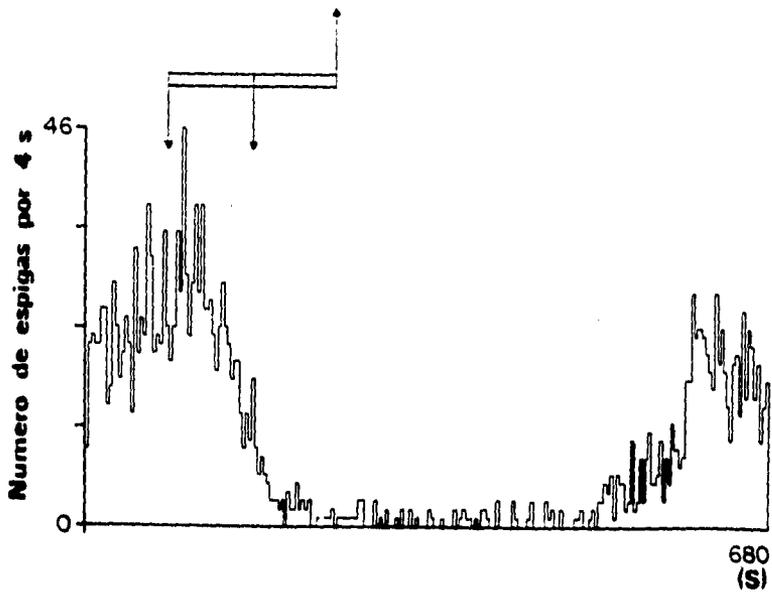
GRUPO EXPERIMENTAL

PESO CORPORAL (g)	COORDENADAS HISTOLOGICAS			LOCALIZACION DE LA PIPETA	EFECTO POR DISTENSION EN LA FCIA.	DISTENSION INICIAL Y RESPUESTA	REBOTE	RECUPERACION DE LA FCIA. INICIAL	CESO LA FRECUENCIA
	ANTERIOR	LATERAL	PROFUNDIDAD (µ)						
254	8.5	1	853	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	374.4	—	67.2	NO
245	8	0.8	1978	GRANULOSA	AUMENTA	232	—	50	NO
273	7.5	1	497	GLOMERULAR	DISMINUYE	226.08	—	57.6	NO
273	7.5	1	497	GLOMERULAR	DISMINUYE	144	—	21.6	NO
236	7.46	1	583	MITRAL Y PLEXIFORME-INT	DISMINUYE	315.9	—	19.5	SI
257	8.5	0.5	727	GLOMERULAR	DISMINUYE	119	—	47.6	SI
286	8.4	1	305	GLOMERULAR	DISMINUYE	195	—	150	NO
286	7.8	1	399	GLOMERULAR	DISMINUYE	147.9	—	125.8	SI
224	9	1.7	784	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	252.5	—	124.8	SI
220	7.8	4	1535	GRANULOSA	DISMINUYE	316.8	—	13.2	SI
220	7.8	4	1535	GRANULOSA	DISMINUYE	237.6	—	48.4	SI
262	7.45	0.4	1799	GRANULOSA	DISMINUYE	406.4	—	108.8	NO
272	7.3	0.9	901	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	116.8	—	52.8	SI
286	8	7.9	582	GRANULOSA	DISMINUYE	153.6	—	36.8	NO
284	8	1	935	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	197.5	—	40	NO
284	8	1	935	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	422.4	—	114.4	NO
284	8	1	935	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	507	—	429	NO
284	8	1	935	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	AUMENTA	120	—	56	NO
284	8	1	1212	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	125	170.2	26.6	SI
284	8	1	1212	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	110.2	—	11.4	SI
284	8	1	1250	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	127.6	—	132	SI
284	8	1	1250	PLEXIFORME-EXT Y MITRAL	DISMINUYE	105.6	—	26.4	SI

Cuadro 2.- Grupo de ratas ovariectomizadas. En el presente cuadro se muestra la frecuencia de las neuronas registradas, la ubicación histológica, la localización de la pipeta en las diferentes capas del B.O. El peso del animal se tomó al momento de hacer el registro.



Graf. 3.- Se muestra inicialmente una ligera disminuci3n al 50 % en la frecuencia del B.O. seguida de un aumento rapido y brusco el cual, lentamente recupera el nivel inicial.



Graf. 4.- Se muestra una disminución en la actividad de la frecuencia del B.O. observese que ocurre una marcada disminución la cual se da de una manera paulatina seguida de una recuperación de la frecuencia la cual también se da de forma paulatina.

En estos casos la respuesta también se presenta de una forma abrupta o paulatina independientemente de que aumente o disminuya la frecuencia. (Graf. 5 y 6).

De los 46 animales (tratados y no tratados) se observó que un 43.5% presentaron una disminución paulatina, el 32.6% un aumento abrupto y un 23.9% una disminución abrupta en la frecuencia.

A los registros obtenidos se les midió la latencia entre la distensión cérvico-vaginal y la respuesta del B.O. a éste estímulo, así como, la presencia o no de un período de rebote y la recuperación de la frecuencia inicial.

Los cuadros 1 y 2 también ilustran los efectos de diferentes frecuencias del estímulo en la descarga de una neurona.

Los 46 datos se usaron en análisis estadísticos para examinar la relación entre los dos grupos de neuronas registradas y comprobar si estas relaciones difieren entre las diferentes capas que constituyen al B.O.

Nuestras observaciones de los datos mostraron diferencias con respecto a la distensión inicial y respuesta así como, en la recuperación de la respuesta inicial con respecto a las capas que constituyen el B.O. (Cuadros 3 y 4).

GRUPO CONTROL

	REG. NO.	DISTENSION INICIAL Y RESPUESTA	REBOTE	RECUPERACION DE LA RESPUESTA INICIAL
CG AL PO ME RU LA R	1	154"	—	228.8"
	2	172"	—	136.4"
	3	115.2"	—	94"
	4	115.2"	—	86.4"
	5	120.4"	—	185"
	6	129"	—	189.2"
	7	508.2"	—	117.6"
		=====		=====
		X=187.714		X=148.2
CP AL PE AX MI TP LE X	1	157"	147.5"	42.5"
	2	133"	99"	19"
	3	177.6"	136.8"	38.4"
	4	270"	—	28"
	5	208"	—	16"
	6	114"	—	36"
	7	369.6"	—	145.2"
	8	190"	—	64.6"
	9	220.8"	—	59.8"
	10	250.3"	—	100"
		=====		=====
		X=209.03		X=54.95"
CG RA PA NU LO SA	1	330"	—	80"
	2	215"	—	60"
	3	336"	—	105.6"
	4	332.5"	—	47.5"
	5	163.2"	—	19.2"
	6	159"	—	72"
		=====		=====
		X=255.950		X=64.05"

Cuadro 3.

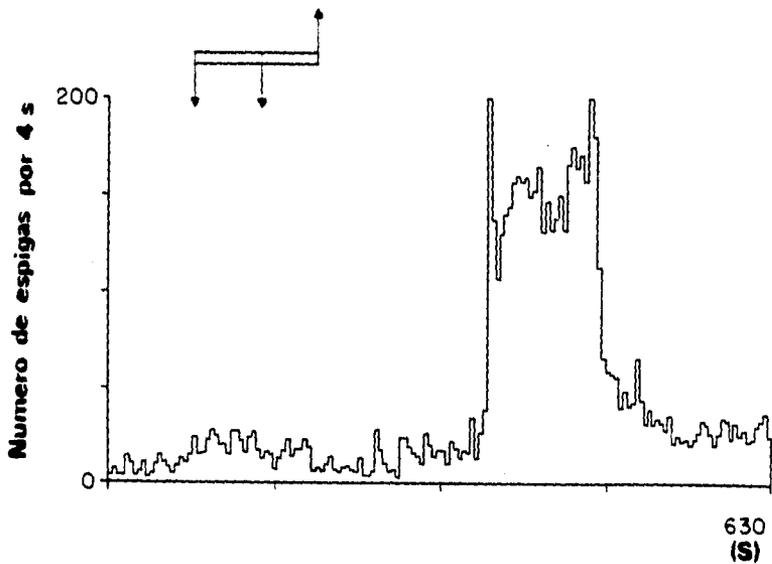
Cuadro Control en el cual se muestra el valor promedio, notándose una diferencia en la distensión inicial y respuesta, así como en la recuperación de la respuesta inicial en las diferentes capas del Bulbo olfatorio.

GRUPO EXPERIMENTAL.

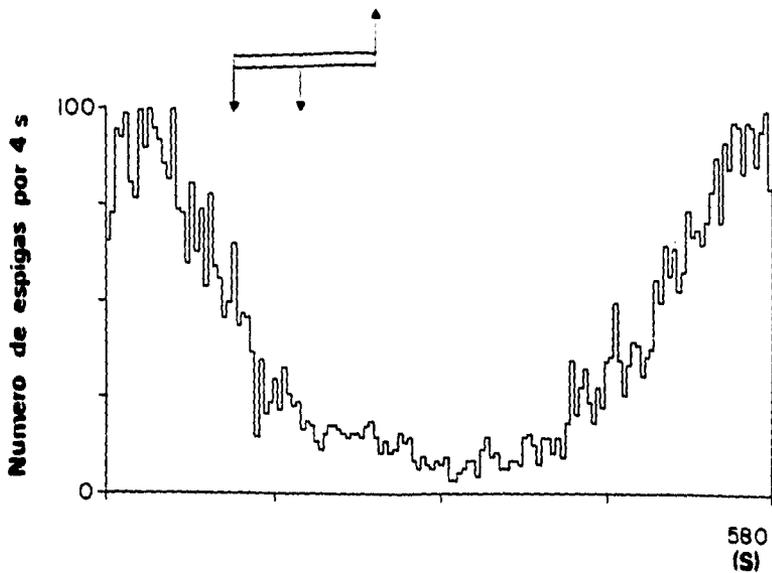
	REG. NO.	DISTENSION INICIAL Y RESPUESTA	REBOTE	RECUPERACION DE LA FRECUENCIA INICIAL
C G A L P O M E R U L	1	119"	—	47.6"
	2	226.8"	—	57.6"
	3	144"	—	21.6"
	4	195"	—	150"
	5	147.9"	—	125.8"
			=====	
		X=166.54		x=80.52
C P A L E X M I T P L E X	1	374.4"	—	67.2"
	2	315.9"	—	19.5"
	3	136.5"	—	27.3"
	4	252.2"	—	124.8"
	5	116.8"	—	52.8"
	6	197.5"	—	40"
	7	422.4"	—	144.4"
	8	507"	—	429"
	9	120"	—	56"
	10	125"	170.2	26.6"
	11	110.2"	—	11.4"
	12	127.6"	—	132"
	13	105.6"	—	26.4"
		=====		=====
		X=223.931		X=86.692
C G A P A N U L O S A	1	232"	—	50"
	2	316.8"	—	13.2"
	3	237.6"	—	48.4"
	4	406.4"	—	108.8"
	5	153.6"	—	36.8"
		=====		=====
		X=269.280		X=51.44

Cuadro 4

Grupo Experimental; en el cual se presenta la diferencia entre la distensión inicial y la respuesta, también la recuperación de la respuesta



Graf. 5.- Se muestra una respuesta de la frecuencia retardada al cesar la distensión cérvico-vaginal, observese un aumento abrupto en la actividad de la neurona registrada seguida de una disminución abrupta al recuperar su nivel inicial.



Graf. 6.- Muestra la respuesta de la frecuencia en los animales ovariectomizados al estímulo cérvico-vaginal. Se observa una disminución en la actividad de la frecuencia durante la distensión cérvico-vaginal, seguida de una recuperación inicial, ambas se dan de forma paulatina.

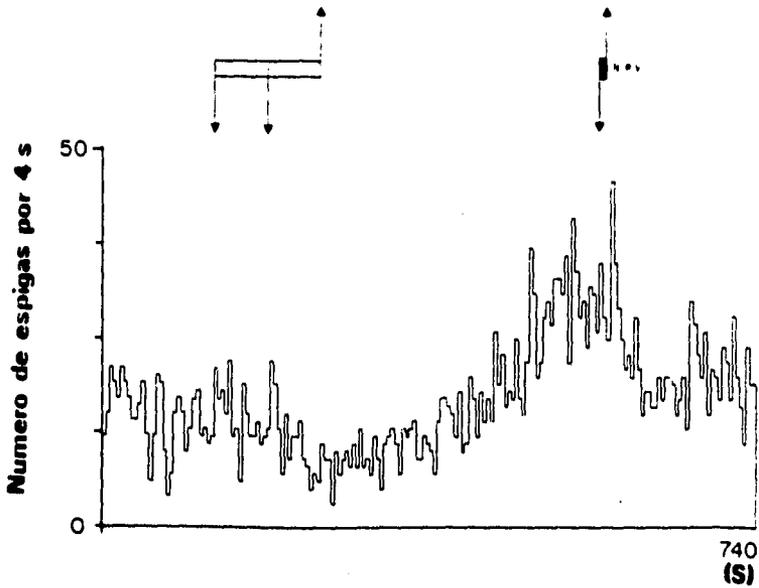
Con ayuda de el análisis discriminatorio canónico así como por la Prueba de Wilkes Lambda se confirmó que sí existía una diferencia significativa entre capas con una $P < 0.01$.

En los Análisis Estadísticos realizados se usó el paquete Estadístico SISTAT. (Ver.2.1).

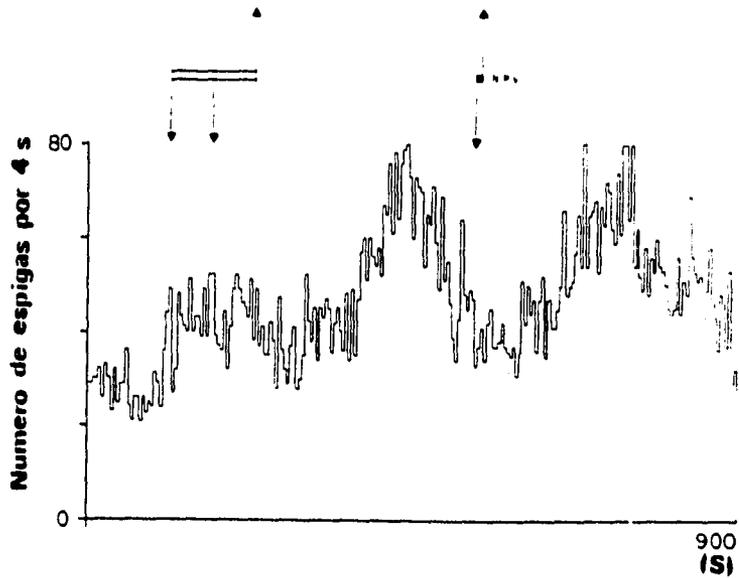
Un tercer grupo de animales íntegros, los cuales respondieron a la distensión cérvico-vaginal presentaron una ligera disminución inicial seguida de un aumento en la frecuencia de descarga en el B.O. A este primer estímulo le continuó un segundo estímulo esta vez en el NPV

Si el estímulo del NPV era dado cuando la frecuencia estaba incrementada era seguida de un descenso en la actividad de la neurona (Graf. 7) mientras que si el estímulo era dado cuando la frecuencia estaba disminuyendo la respuesta que se observó es una ligera prolongación de esa disminución para posteriormente incrementarse hasta presentarse la recuperación de la frecuencia inicial. (Graf. 8).

La fig. 15 muestra el sitio (marca azul) de estimulación en NPV.



Graf. 7.- Muestra la actividad del B.O. ante la distensión cérvico-vaginal. Notese que ocurre un ligero decremento inicial seguido de un incremento en frecuencia de descarga en el B.O. Al estiomular NPV se observa un decremento en la frecuencia. Tanto el decremento como la recuperación al nivel inicial se da de una forma paulatina.



Graf. 8.- Se muestra la actividad del B.O. ante la distensión c ervico-vaginal. Se observa un ligero decremento inicial seguido de un incremento de la frecuencia de descarga en el B.O. Al estiomular NPV se observa una ligera prolongacion en la disminución de la frecuencia, para posteriormente incrementarse.



Fig. 15.- Fotomicrografía de un corte transversal de cerebro de rata. se observa el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV). La flecha señala el deposito de ferrocianuro de potasio dejado por el electrodo de una ligera prolongacion en la disminucion de registro.
Tinción con cresil violeta.

DISCUSION.

Al determinarse el estado estral de cada uno de los animales en el primer grupo, se encontró que dependiendo de la fase en la que se encontraban (Diestro, Proestro, Estro) la actividad eléctrica registrada en el B.O. era diferente.

Estudios realizados por Cartas-Heredia y cols. (1978) reportan aumentos significativos en la actividad espontánea del B.O, del tubérculo olfatorio (T,O) y de la corteza prepiriforme (C.P.P) ante la estimulación hipotalámica para animales en estro comparados con animales en anestro.

En nuestros experimentos la actividad espontánea registrada del B.O. en los animales en estro es de mayor frecuencia con respecto a los animales en proestro o diestro, pero al aplicar el estímulo cérvico-vaginal independientemente de la fase en que se encuentre el animal, la actividad eléctrica del B.O. va a aumentar o a disminuir. No solamente un incremento como lo reportó Cartas-Heredia.

En el segundo grupo los animales estuvieron ovariectomizados y se les determinó igual que en el primer grupo frotis vaginal para cerciorarnos de la fase en la que se encontraban del ciclo estral y como era de esperarse todos estaban en diestro. Los frotis coincidieron con lo reportado por Solano-Flores (1982). La actividad eléctrica del B.O.

ante el estímulo cérvico-vaginal, aun cuando todos los animales presentaban una fase en diestro reportaban un incremento o una disminución de la frecuencia de disparo de esas neuronas.

Por lo que suponemos que la fase en la que se encuentre el animal de el ciclo estral no es determinante en la actividad del B.O. en ratas íntegras como en ratas ovariectomizadas ya que la frecuencia de disparo de las neuronas registradas en ambos casos presentan un aumento o una disminución ante el estímulo cérvico-vaginal.

Puesto que las respuestas observadas fueron similares en los animales ovariectomizados como en el grupo control, esto demuestra que la distensión cervico-vaginal va a provocar un cambio independiente de uno u otro caso sobre el nivel de actividad de estas estructuras olfatorias.

Los resultados en los cuadros 1 y 2 muestran como la distensión cérvico-vaginal siempre tuvo efecto sobre el B.O. presentando un incremento en la actividad de la frecuencia o un decremento de la misma.

Estos incrementos o decrementos en la actividad de la frecuencia de las neuronas registradas se presentaron de dos formas: 1) de una manera paulatina y 2) de una manera abrupta, éstos comportamientos observados suponemos pueden deberse a varias variables, como puede ser: el tipo de capa que esta siendo registrada, la profundidad a la que esta

siendo registrada, el estado hormonal del animal o que el comportamiento dependa de la misma neurona.

En un corte vertical y cransversal del B.O. se distinguen diversas capas alternantes de sustancia gris y blanca. Golgi cuenta 3 estratos que son de la periferia al centro: 1) estrato superficial o fibrilar; 2) estrato medio ó de sustancia gris y 3) estrato profundo ó de sustancia blanca.

Coincidimos con lo observado por Golgi, tomando para fines de nuestro trabajo 3 capas que en nuestro caso fueron de la periferia al centro: 1)capa glomerular; 2) capa plexiforme-mitral-plexiforme y 3)granulosa.

Los registros en éstas capas muestran que la actividad en la frecuencia de las neuronas varía, presentandose una menor actividad en la capa glomerular y una mayor en la granulosa. Cuadro 3 y 4 .

Shepherd (1963) reporta que la mayor actividad espontánea en el B.O. se da en las células mitrales, en lo que según nuestros resultados marcan diferencias.

Se observó además que al presentarse la distensión cérvico-vaginal la mayor actividad en la frecuencia de las neuronas se da en las células granulosas, esto puede ser probablemente debido a las posibles vías de entrada y salida en el B.O. y las conexiones entre cada una de las capas.

Con respecto a la capa glomerular, nuestros resultados no son consistentes con los de García-Díaz, y cols. (1984) en algunos aspectos: La actividad en la capa glomerular observada por estos autores es generalmente más pequeña al usar altas frecuencias de estímulo, sin embargo algunas neuronas disminuyen, cuando se aplican bajas frecuencias de estímulo y se aumentan durante el estímulo de altas frecuencias. Nuestras observaciones demuestran que la actividad espontánea en la capa glomerular va a responder con un aumento o una disminución en la frecuencia ante un estímulo, el cual siempre fue el mismo.

Con respecto al tercer grupo se observó que el potencial provocado en el B.O. por el estímulo cervico-vaginal, seguido de un estímulo eléctrico presentó cambios en la actividad de la frecuencia del B.O. debido a la lesión en el NPV.

Estos resultados indican que el N.P.V. modula una influencia en el B.O; por otra parte se sabe que el estímulo del B.O. reduce la actividad neuronal en el NPV (Guevara-Guzmán, y cols. 1991).

CONCLUSION.

Se mostró que la distensión cérvico-vaginal en los animales íntegros y en los ovariectomizados siempre se desencadenó un efecto sobre el B.O. Este efecto se presentó particularmente de dos maneras: 1) en un incremento de la frecuencia ó 2) en un decremento de la misma.

La estimulación externa cervico-vaginal en ambos grupos (control y experimental) presentó un comportamiento similar ya que no se presentaron alteraciones significativas en la descarga de las frecuencias de ninguna de las neuronas observadas en este trabajo.

Las neuronas registradas en las diversas capas presentaron diferencias en la actividad de la frecuencia al estímulo cervico-vaginal.

Se observó que la estimulación eléctrica del N.P.V. cambió la actividad en el B.O. posterior a la respuesta obtenida por la estimulación cervico-vaginal.

BIBLIOGRAFIA.

- Akaishi, T; Robbins, A; Sakuma, Y. y Sato, y. (1988). Neural Inputs from the Uterus to the Paraventricular Magnocellular Neurons in the Rat. *Neuroscience Letters*. 84:57-62.
- Barraclough, C. A. y Cross, B. A. (1963). Unit Activity in the Hypothalamus of the Cyclic Female Rat: Effect of Genital Stimuli and Progesterone. *J. Endocrin.* 26:339-359.
- Best y Taylor. (1986). *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica* Ed.Médica panamericana. Argentina. p.p.1572.
- Brooks, C. Mc; Ishikawa, T; Koizumi, K. y H-H. W. (1966). Activity of Neurones in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Its Control. *J. Physiol.* 182:217-231.
- Burton M. S. y Steven. H. (1980). *A Stereotaxic Atlas of the Rat Olfactory System*. Ed. ANKHO International Inc. New York.
- Cartas-Heredia, L; Guevara-Aguilar, R. y Aguilar-Baturoni, H. U. (1978). Oestrogenic Influences on the Electrical Activity of the Olfactory Pathway. *Brain Research Bulletin*. 3:623-630.
- Cross, B. A. (1968). Electrophysiological Studies on the Hypothalamus. *Brit Med. Bull.* 22:254-260.
- Cuschieri, A. y Bannister, L. H. (1975). The Development of the Olfactory Mucosa in the Mouse: Light Microscopy. *J. Anat.* 119:277-286.
- Fahrbach, S; Morrell, J. I; Pfaff, D. W. (1985). Possible Role for Endogenous Oxytocin in Estrogen-Facilitated Maternal Behavior in Rats. *Neuroendocrinology*. 40:526-532.
- Ferguson, J. K. W. (1941). A Study of the Motility of the Intact Uterus at Term.Surgery Gynec. Obstet. 73:359-366.

- García-Díaz, D. E; Aguilar-Baturoni, H. U. y Guevara-Aguilar, R. (1984). Vagus Nerve Stimulation Modifies the Electrical activity of the Olfactory Bulb. Brain research bulletin. 12:529-537.
- Gesteland, R. C; Yancey, R. A. Farbman, A.I. (1982). Development of Olfactory Receptor Neuron Selectivity in the Rat Fetus. Neuroscience. 7:3127-3136.
- Guevara-Aguilar, R; Solano-Flores, L. P; García-Díaz, D. E; Aguilar-Baturoni, H. U. (1985). Effects of Dopamine and Norephrine on Neuronal Activity of the Olfactory Tubercle. Brain Research Bulletin. 15:665-668.
- Guevara-Guzmán, R; García-Díaz, D. E; Solano-Flores, L. P. (1991). Role of the Paraventricular Nucleus in the Projection from the Nucleus of the Solitary Tract to the Olfactory Bulb. Brain Research Bulletin. 27:447-450.
- Ortega-Villalobos, M; García-Bazán, M; Solano-Flores, L. P; Ninomiya-Alarcón, J. G; Guevara-Guzmán, R. (1990). Vagus Nerve Afferente and Efferente Innervation of the Ray Uterus: An Electrophysiological and HRP Study. Brain Research Bulletin. 25:365-371.
- Paxinos y Watson. (1982). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. Sydney. New York.
- Pirlot, P. (1979). Morfología Evolutiva de los Cordados. Ed. Omega. Barcelona. España.
- Poulain, D. A. y Wakerley, J. B. (1982). Electrophysiology of Hypothalamic Magnocellular Neurons Secreting Oxytocin and vasopressin. Neuroscience. 7 (4), 773.
- Richard, Ph. (1970). An Electrophysiological Study in the Ewe of the Tracts which Transmit Impulses from the Mammary Glands to the Pituitary Stalk. J. Endocr.47:37-44

- Roberts, J. S. y Share, L. (1968). Oxytocin in Plasma of Pregnant, Lactating and Cycling ewes During Vaginal Stimulation. *Endocrinology*. 83:272-278.
- Roberts, J. S. y Share, L. (1969). Effects of Progesterone and Estrogen on Blood Levels of Oxytocin During Vaginal Distensión. *Endocrinology*. 84:1076-1081.
- Roberts, J. S. (1971 b). Progesterone-Inhibition of Oxytocin Release During Vaginal Distention: Evidence for a Central Site of Action. *Endocrinology* 89:1137-1141
- Scott, J. W. y Pfaffmann, C. (1972). Characteristics of Responses of Lateral Hypothalamic Neurons to Stimulation of the Olfactory System. *Brain Research*. 48:251-264.
- Shepherd, G. M. (1963). Neuronal Systems Controlling Mitral cell Exitability. *J. Physiol*. 168:101-117.
- Solano-Flores, L.P; Aguilar-Baturoni, H. U. y Guevara-Aguilar, R. (1982). Transient Cessation of Female Rat Sexual Cycle After Electrolytic Damage of Locus coeruleus. *Brain Research Bulletin*. 8:703-709.
- Tresguerres, J. A. F. (1992). *Fisiología Humana*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. España. p.p.1216