

03068

1
20j.

EVIDENCIAS ELECTROFISIOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS DE LA
INFLUENCIA DEL LOCUS COERULEUS SOBRE EL TUBERCULO
OLFATORIO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS (ÁREA FISIOLÓGICA) PRESENTA EL ING. QUÍM.
LUIS PASTOR SOLANO FLORES.

1980

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

Capítulo 1 INTRODUCCION

I.- Presentación	1
II.- Influencias centrifugas sobre el bulbo olfaterio	2
III.- El tubérculo olfatorio como estructura moduladora de la actividad olfatoria	4
IV.- El locus coeruleus como estructura capaz de influir en la actividad de todo el encéfalo	5
V.- Relación del locus coeruleus con las estructuras olfatorias	6
VI.- Planteamiento del tema de estudio	7

Capítulo 2 METODOS

I.- Presentación	8
II.- Registro de potenciales provocados	8
a) Animal	8
b) Anestesia	9
c) Procedimientos quirúrgicos	9
d) Mantenimiento de la preparación	9
e) Electrodo	9
f) Estereotaxia	10
g) Verificación electrofisiológica del sitio de estimulación	10
h) Estimulación y registro	10
i) Verificación histológica de los sitios de estimulación y registro	11
III.- Registro de actividad unitaria	11
a) Animal	11
b) Anestesia	11
c) Procedimientos quirúrgicos	12
d) Mantenimiento de la preparación	12
e) Electrodo de estimulación	12
f) Electrodo de registro	13
g) Estereotaxia	13
h) Verificación electrofisiológica del sitio de estimulación	13
i) Estimulación y registro	13
j) Verificación histológica de los sitios de estimulación y registro	14
k) Análisis de los datos	15

IV.- Rastreo retrógrado de la peroxidasa del rábano	15
a) Animales	15
b) Anestesia y procedimientos quirúrgicos	16
c) Aplicación de la peroxidasa	16
d) Perfusión	16
e) Procesamiento del tejido	17
f) Análisis	17

Capítulo 3
RESULTADOS

I.- Presentación	19
II.- Potenciales provocados	19
III.- Actividad unitaria	21
IV.- Peroxidasa del rábano	23
V.- Figuras	24

Capítulo 4
DISCUSION

I.- Presentación	40
II.- Potenciales provocados	40
III.- Actividad unitaria	43
IV.- Peroxidasa del rábano	44
V.- La capa polimórfica del tubérculo olfatorio	45
VI.- El tubérculo olfatorio y el locus coeruleus como sistemas moduladores	46
VII.- Comentario final	47

Capítulo 5
REFERENCIAS

48

CAPITULO I INTRODUCCION

I.- PRESENTACION

La regulación de la entrada y de la transmisión de la información sensorial hacia el sistema nervioso central ha sido tema de amplia investigación.

Se han descrito mecanismos de control centrífugo en diversas modalidades sensoriales: en la vía auditiva (Gulambos y Davis, 1944; Pickles y Comis, 1973), en la vía visual (Granit, 1955; Hernandez-Peón y cols., 1958; Jacobson y Gestring, 1958), en el mantenimiento del tono muscular (Granit, 1975), en el sistema gustativo (Chernotski, 1964) y en el sontido del tacto (Loewenstein, 1956).

El estudio de este problema ha puesto de manifiesto que las señales transmitidas hacia el cerebro desde los órganos sensoriales dependen no sólo de los estímulos físicos que im pactan sobre el receptor, sino que estas señales son modificadas por el propio cerebro. Así pues, la información recibida por el cerebro no es simplemente e indiscriminadamente la traducción del ambiente físico del organismo, sino que de pende de la actividad del propio sistema nervioso (Hernandez-Peón, 1959). La información originada en los receptores es filtrada y modificada en su trayectoria hacia los niveles finales de la integración y percepción sensorial. Cada sentido está provisto de mecanismos que regulan la intensidad con que es estimulado el órgano sensorial. La regulación de la conducción de información sensitiva es ejercida por múltiples influencias originadas en diversos niveles de integración del sistema nervioso central y que actúan sobre cada uno de los diferentes elementos neuronales de la vía desde los receptores, sus enlaces sinápticos hasta sus efectores (Alcocer-Cuadrón y Aréchiga, 1968).

En el sistema olfatorio se ha estudiado ampliamente este problema. El bulbo olfatorio (BO) se presenta como la primera estación de relevo de la información olfatoria, llevándose ya a cabo en él, la codificación de la información (Hara y cols., 1973). Esta información es transmitida a estaciones secundarias. Se ha demostrado que estas estaciones ejercen a su vez influencia en el BO. Por otro lado están sometidas ellas, a influencias de otras estructuras siendo de esta forma moduladas también. Esta cadena representa un interesante tema de estudio.

El tubérculo olfatorio (TO) siendo una estación de relevo de la información olfatoria y el locus coeruleus (LC) siendo una estructura de interés actual en mecanismos de modulación cuyas características aferentes y eferentes son hasta ahora únicas, se vinculan en el presente estudio.

II.- INFLUENCIAS CENTRIFUGAS SOBRE EL BULBO OLFATORIO

Desde la aparición de los trabajos histológicos de Ramón y Cajal en 1890, que hablan de la presencia de fibras centrifugas en el BO, se han realizado gran cantidad de trabajos dirigidos a localizar su origen.

Un buen número de estudios histológicos presentan evidencias de que estructuras intrarhinencefálicas envían sus axones hacia el BO. Cragg, después de efectuar lesiones en la corteza prepiriforme, tubérculo olfatorio y comisura anterior, encontró fibras degeneradas en la capa interna del BO así como alrededor de los glomérulos que es el sitio en el cual se establece el primer relevo de la información olfatoria (Cragg, 1962). Estos resultados fueron confirmados por Heimer (Heimer, 1968). La técnica de rastreo retrógrado de la peroxidasa del rábano (PR) ha permitido demostrar que el BO recibe proyecciones provenientes de los núcleos

olfatorios anteriores, de la corteza prepiriforme, del brazo horizontal de la banda diagonal y del tubérculo olfatorio (Dennis y Kerr, 1976; Broadwell y Jacobowitz, 1976; Shafa y Meisami, 1977).

Resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas completan la información histológica. Kerr y Hagbarth encontraron depresión de la actividad del BO por la estimulación de la corteza prepiriforme, del tubérculo olfatorio y de la amígdala (Kerr y Hagbarth, 1975). Estimulando diversas regiones intrarriencefálicas se han registrado potenciales provocados en el BO (Dennis y Kerr, 1968; Makashima y cols., 1978).

Diversos trabajos han mostrado que estructuras extrarriencefálicas también ejercen su influencia en la actividad del BO. Arduini y Moruzzi al estimular con bajas frecuencias los núcleos talámicos intralaminares obtuvieron ondas reclutantes en el BO las cuales eran bloqueadas por la estimulación con altas frecuencias de la formación reticular bulbar (Arduini y Moruzzi, 1953). Lavín encontró que diversos tipos de estímulos sensoriales provocaron un aumento de la actividad eléctrica del BO; la estimulación eléctrica de la formación reticular mesencefálica ocasionó el mismo fenómeno (Lavín y cols., 1954). Yamamoto e Iwana al estimular la formación reticular suprimieron en el BO la actividad eléctrica intrínseca y la inducida por estimulación olorosa. Al estimular el hipotálamo posterior lograron aumentar ambas clases de actividad (Yamamoto e Iwana, 1960). Por otra parte, la estimulación de la formación reticular provoca cambios en la actividad de neuronas registradas en diferentes capas del BO (Mancia y cols., 1962).

III.- EL TUBERCULO OLFATORIO COMO ESTRUCTURA MODULADORA DE LA ACTIVIDAD OLFATORIA

El TO al igual que otras estructuras olfatorias, presenta una inervación recíproca con el BO. Es bien sabido que la capa superficial del TO recibe las fibras provenientes del BO (Heinor, 1968; Price y Powell, 1971; Price, 1973), mientras que en la capa polimórfica o profunda se encuentran las neuronas que proyectan hacia el BO (Dennis y Kerr, 1976; Shafa y Meisani, 1977). Se ha demostrado que el TO ejerce sobre el BO una profunda influencia depresora en su actividad de fondo o en la inducida por estimulación olorosa (Kerr y Hagbarth, 1975).

El TO mantiene comunicación con otras estructuras olfatorias. Así, recibe proyecciones de los núcleos del tracto olfatorio lateral, de la corteza entorrinal, de la corteza prepiriforme, de la banda diagonal de Broca y del núcleo cortical amigdalino (Haberly y Price, 1978; Valverde, 1963).

El TO es una estructura sometida a la influencia de estructuras más caudales. Se ha demostrado histológicamente que el TO recibe fibras provenientes del núcleo tuberomamilar, de regiones mediales y dorsales del hipotálamo, de los núcleos paraventriculares y parafasciculares talámicos, de los núcleos del rafe dorsal y mediano, del área dopaminérgica ventral tegmental y de la sustancia nigra (Haberly y Price, 1978). Cragg encontró fibras degeneradas en el TO después de efectuar lesiones en la formación reticular mesencefálica (Cragg, 1962). Guevara mediante la técnica de potenciales provocados dió apoyo a la existencia de una vía procedente de regiones bulbomesencefálicas hacia el TO y otras estructuras olfatorias (Guevara y cols., 1973). Aguilar y Guevara mediante esta misma técnica pusieron de manifiesto la comunicación existente entre regiones hipotalámicas y regiones olfatorias, entre ellas incluye el TO (Aguilar y cols., 1976; Guevara y Aguilar, 1978).

Se ha enfatizado el papel importante que el TO despliega como estructura de relevo final para las influencias eferentes que actúan sobre el BO (Guevara y cols., 1973; Aguilar y cols., 1976). Ya se ha remarcado que entre las varias estructuras olfatorias, el TO se encuentra en una posición única debido a que es una estación de relevo en el curso de la información olfatoria hacia el diencéfalo (Heimer, 1968; Scott y Chafin, 1975) y el septum (Valverde, 1963).

IV.- EL LOCUS COERULEUS COMO ESTRUCTURA CAPAZ DE INFLUIR EN LA ACTIVIDAD DE TODO EL ENCEFALO

Haciendo uso de métodos histoquímicos de fluorescencia sensibles y específicos para detectar monoaminas, Anden demostró la presencia de sistemas neurales de naturaleza monoaminérgica cuyos axones ascienden desde el tallo cerebral bajo hacia el encéfalo rostral (Anden y cols., 1966). Axones noradrenérgicos provenientes del LC forman uno de estos sistemas ascendentes. Loizou remarca la naturaleza difusa de la proyección eferente que parte del LC (Loizou, 1969). Ungerstedt reportó que lesiones del LC producen pérdida de terminales noradrenérgicas en las cortezas cerebrales, cerebelosas y el hipocampo; asimismo puso de manifiesto que los axones originados en las neuronas del LC proporcionan terminaciones noradrenérgicas en prácticamente todas las áreas del cerebro (Ungerstedt, 1971). Presentó también evidencias de que una sola neurona del LC puede inervar simultáneamente varias regiones de las cortezas. Lindvall presentó una detallada descripción del trayecto seguido por el haz noradrenérgico dorsal que es la vía que los axones del LC siguen en su ascenso al encéfalo rostral (Lindvall, 1974). Este haz, después de pasar por la zona incerta, entra a formar parte del haz prosencefálico medial para inervar al tálamo, a las cortezas, al hipocampo y algunas regiones límbicas.

Diversos autores han ampliado el estudio de los territorios de terminación de los axones noradrenérgicos originados en el LC. Dichos territorios comprenden tanto el cordón espinal (McBride y Sutin, 1976) como las cortezas cerebrales (Kobayashi y cols., 1974) y cerebelosas (Olson y Fuxe, 1971), abarcando áreas reticulares mesencefálicas (Sakai y cols., 1977), núcleos talámicos (Kobayashi y cols., 1974) así como núcleos hipotalámicos (Swanson y Hartman, 1975).

El LC es un centro de convergencia que recibe gran variedad de información aferente proveniente de diversas regiones. Entre éstas están incluidos los núcleos del rafe, la substancia gris central, la formación reticular, los núcleos vestibulares y núcleos del tracto solitario, el núcleo fastigio del cerebelo, las zonas marginales del cordón espinal, las áreas hipotalámicas dorsomedial, paraventricular y lateral, los núcleos de la estria terminalis, la región preóptica, el núcleo central de la amígdala y la corteza insular (Cedarbaum y Aghajanian, 1978), los núcleos ventrolateral y parafascicular talámicos (Clavier, 1979), así como la sustancia nigra (Sakai y cols., 1977).

Una completa y profunda revisión sobre la biología del LC fué presentada por Amaral en 1977 (Amaral y Sinnamon, 1977).

Así pues el LC queda colocado en una posición privilegiada que le permite ejercer ampliamente su influencia en todo el encéfalo, participando así en un gran número de funciones como estructura moduladora (Amaral y Sinnamon, 1977).

V.- RELACION DEL LC CON ESTRUCTURAS OLFATORIAS

Broadwell demostró mediante la técnica de rastreo retrógrado de la FR que, neuronas del LC envían sus axones hacia el BO (Broadwell y Jacobowitz, 1976). Estas proyecciones se han confirmado electrofisiológicamente pues se ha obte-

nido activación antidrómica de neuronas del LC por estimulación eléctrica del DO (Faiers y Mogenson, 1976; Takigawa y Mogenson, 1977).

En los primeros trabajos de localización de la distribución de fibras del LC en el encéfalo no se reportó la presencia de fibras del LC en el TO (Loizou, 1969; Segal y cols., 1973). La inervación de otras estructuras olfatorias por el LC hasta muy recientemente se ha puesto de manifiesto mediante autoradiografía (Jones y Moore, 1977). Estudios de fluorescencia han mostrado la presencia de inervación noradrenérgica en las capas del TO (Fallon y Moore, 1978).

VI.- PLANTEAMIENTO DEL TEMA DE ESTUDIO

- Debido a que el TO es una estructura importante en el procesamiento y transmisión de la información olfatoria,
- debido a que el TO recibe influencia de regiones más caudales, modulando a su vez la entrada olfatoria y
- debido a que el LC se presenta como un núcleo capaz de influir en la actividad de casi todo el encéfalo, se llevó a cabo el presente trabajo con el propósito de estudiar la relación que existe entre el LC y el TO.

b) ANESTESIA. Los animales fueron anestesiados por vía intravenosa con cloralosa a una dosis de 70 mg/kg. Para inducir relajación preanestésica se hizo respirar al animal vapores de éter etílico. Algunos animales fueron paralizados con galamina o con D-tubocurarina. La respiración se mantuvo artificialmente. Las heridas quirúrgicas y los puntos de contacto con el aparato esterotáxico fueron anestesiados con xilocaina en pasta.

c) PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS. La cabeza del animal se colocó en un aparato esterotáxico marca David Kopf Instruments. El pelo de la cabeza fué rasurado. Se efectuó un corte en la piel que cubre el techo del cráneo en dirección antere-posterior y a lo largo de la línea media sagital. La incisión abarcó desde la región de los senos frontales hasta un centímetro por atrás de la incisura ósea parieto-occipital. Los bordes de la herida fueron separados dejándose así el cráneo al descubierto. Con una fresa instalada en un motor manual se efectuaron trópanos en los lugares por donde los electrodos pasarían. La duramadre subyacente fué cuidadosamente retirada con la punta de una aguja hipodérmica. El tejido cerebral expuesto fué cubierto con aceite mineral para evitar su deshidratación por evaporación.

d) MANTENIMIENTO DE LA PREPARACION. A lo largo del experimento, la temperatura del animal se mantuvo entre 37 y 38 °C; para el efecto se le colocó un cojín termoelectrico debajo del vientre y tórax y su cuerpo fué envuelto en frangla. Con un termómetro de mercurio instalado rectalmente se verificó su temperatura cada media hora. La frecuencia cardiaca se verificó constantemente mediante una bocina conectada a un sistema de electrocardiografía.

e) ELECTRODOS. Electrodo**s** bipolares concéntricos fueron usados para estimular y para registrar. El electrodo externo y superior era de tubo de acero inoxidable aislado; el electrodo interno e inferior era de alambre de nichrome aislado. El

diámetro externo del electrodo fué de 900 μ m. La separación entre las dos puntas fué de 1 milímetro. La resistencia eléctrica del electrodo opuesta al paso de la corriente directa medida en solución salina fué de 200 KO aproximadamente.

f) ESTERECTAXIA. Las puntas de los electrodos de estimulación y de registro se colocaron esterotáxicamente en su posición según las coordenadas obtenidas del Atlas esterotáxico del cerebro del gato de Snider y Niemer (Snider y Niemer, 1961). Las coordenadas seguidas para alcanzar el TO fueron A= 18.5; L= 3.0; H= -3 a -4 y las usadas para alcanzar el LC fueron F= 2.5; L= 2.0; H= -2.0. La punta del electrodo de registro se instaló en la región del TO siguiendo un trayecto dorso-ventral vertical. Debido a que la tienda del cerebelo en el gato está situada por encima del LC no es posible abordar esta estructura en dirección vertical dorso-ventral. Así pues el electrodo de estimulación del LC fué inclinado 45° en dirección anteroposterior quedando la punta anterior.

g) VERIFICACION ELECTROFISIOLOGICA DEL SITIO DE ESTIMULACION. Con el propósito de saber si la punta del electrodo de estimulación alcanzó al LC se estimuló eléctricamente durante 2 a 5 segundos con pulsos cuadrados de 0.2 msec de duración y 400 a 600 μ amp de intensidad a una frecuencia de 30 a 40 Hz. Este patrón de estimulación con una punta de electrodo bien colocada ocasionó durante el periodo de estimulación, bradicardia y aumento de la frecuencia respiratoria con disminución de la amplitud del movimiento respiratorio (Ward y Gunn, 1976). Al concluir el tren de estimulación fué frecuente observar un súbito y profundo movimiento inspiratorio.

h) ESTIMULACION Y REGISTRO. Pulsos cuadrados únicos de 0.2 a 0.3 msec de duración y de 0.8 a 2.5 μ amp de intensidad se aplicaron al LC mediante un estimulador marca Grass S88 a través de una unidad de aislamiento marca Grass ISI06. El potencial provocado registrado bipolarmente en la región del

CAPITULO 2

MÉTODOS

I.- PRESENTACION

Dos métodos electrofisiológicos y un método histológico fueron utilizados en el presente estudio.

Se utilizó la técnica de potenciales provocados debido a que ofrece, a pesar de sus limitaciones, la posibilidad de poder determinar si dos estructuras están conectadas funcionalmente (Chang, 1959). Este método proporciona información sobre la actividad global desencadenada en la estructura registrada debido a la estimulación de otra. El registro bipolar tiene la ventaja de captar la actividad exclusiva de la región (Rudomín y cols., 1965).

El registro de actividad unitaria presenta la ventaja de dar información sobre la actividad exclusiva de una única neurona de entre una heterogénea población de neuronas; asimismo, con este método es posible valorar si una estructura al ser estimulada influye en la actividad de la unidad registrada.

Gracias a la avidez que presentan las neuronas para captar y transportar la enzima peroxidasa del rábano ha sido posible trazar un sinnúmero de proyecciones neurales directas (LaVail y LaVail, 1972; Lynch y cols., 1974; Miner, 1977). Esta técnica se usó con el propósito de apoyar los datos obtenidos con las técnicas electrofisiológicas.

II.- REGISTRO DE POTENCIALES PROVOCADOS

a) ANIMAL. Los experimentos de registro de potenciales provocados en el TO por estimulación del LC se llevaron a cabo en 16 gatos adultos, machos o hembras de 2 a 3 kilogramos de peso.

TO fué amplificado con un preamplificador marca Grass P511. El potencial se registró en la pantalla de memoria de un osciloscopio de rayos catódicos marca Tektronix 5103N de donde fueron fotografiados con una cámara quimográfica marca Grass. Las fotografías tomadas fueron proyectadas sobre papel milimétrico para su análisis.

i) VERIFICACION HISTOLOGICA DE LOS SITIOS DE REGISTRO Y ESTIMULACION . Al final del experimento se anestesió profundamente al gato. Los sitios de estimulación y de registro fueron destruidos electrofóticamente pasando por las puntas de los electrodos durante 10 segundos una corriente directa de 1 mamp. El cerebro del animal fué perfundido con 100 ml de solución salina isotónica inyectada en una de las arterias carótidas. Inmediatamente después se fijó el cerebro con 100 ml de una mezcla de 70 ml de formol al 10% y 30 ml de solución de ferrocianuro de potasio al 3%, inyectados en la misma forma. Con un microtomo de congelación se obtuvieron del cerebro cortes histológicos de 100 μ m de espesor. Los cortes histológicos fueron montados en laminillas de vidrio y teñidos con rojo neutro. Los sitios de estimulación y de registro fueron verificados en el corte histológico al distinguirse una mancha azul, producto de la reacción del ferrocianuro de potasio con el hierro depositado por el electrodo (Guzmán y cols., 1958). El encojimiento del tejido fija do se consideró al verificar los sitios de registro.

III.- REGISTRO DE ACTIVIDAD UNITARIA

a) ANIMAL. En los experimentos de registro de actividad unitaria se utilizaron 18 ratas de la cepa Wistar, machos o hembras, de 270 a 310 gramos de peso.

b) ANESTESIA. Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con hidrato de cloral (400 mg/kg), o con uretano (1200 mg/kg), o bien con pentobarbital sódico (35 mg/kg). A

lo largo del experimento, dosis adicionales del anestésico usa do se aplicaron en caso necesario. Pasta de xilocaina se apli có en las heridas quirúrgicas y en los puntos de contacto de la cabeza del animal con el aparato estereotáxico.

c) PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS. La cabeza de la rata fué colocada en un aparato estereotáxico marca David Kopf Instru-
ments. El pelo de la parte superior de la cabeza fué rasurado. Se efectuó una incisión en la piel que cubre el cráneo en di-
rección anteroposterior y a lo largo de la línea media sagital. La herida avareó desde 5 mm anterior a la cisura ósea bregma hasta 5 mm posterior a la cisura ósea lambda. Los bordes de la herida fueron separados dejando así el cráneo al descubierto. Con una fresa montada en un motor manual se efectuaron trépa-
nos en el cráneo en los sitios por donde los electrodos pasarían. Con la punta de una aguja hipodérmica la duramadre sub yacente se retiró bajo control microscópico. Aceite mineral fué colocado en el tejido cerebral expuesto para evitar su des hidratación.

d) MANTENIMIENTO DE LA PREPARACION. A lo largo del expe-
rimento se mantuvo la temperatura del animal entre los 37 y los 38 °C mediante un cojín termoelectrico de corriente direc-
ta. El sistema de calentamiento del animal fué controlado au-
tomáticamente usándose como señal de retroalimentación la tem-
peratura rectal de la rata detectada por un termistor. Un ter-
mómetro de mercurio instalado en el recto permitió verificar
regularmente la temperatura. Los experimentos duraron de 3 a
6 horas.

e) ELECTRODOS DE ESTIMULACION. Para estimular eléctrica-
mente la región del LC se utilizaron electrodos de acero inoxi-
dable bipolares de barras paralelas. El ancho total del elec-
trodo fué de 700 μ m. La punta superior estaba separada 300 μ m
de la punta inferior. La resistencia opuesta por el electrodo
al paso de la corriente directa medida en solución salina fué
de 0.5 MO.

f) ELECTRODOS DE REGISTRO. Para registrar la actividad de neuronas localizadas en el TO se usaron micropipetas de vidrio llenadas con una solución de cloruro de sodio 2 M saturada en el colorante "fast green" (Thomas y Wilson, 1965). Las micropipetas tenían una fibra de vidrio en su interior para facilitar su llenado en el momento de uso (Tasaki y cols., 1968). Las puntas de las pipetas se cortaron bajo control microscópico a un tamaño de 3 a 10 μ m. La resistencia opuesta al paso de la corriente directa medida en solución salina fué de 2 a 8 MO.

g) ESTERECTAXIA. Las intersecciones de la cisura ósea longitudinal con las cisuras óseas bregma y lambda respectivamente fueron colocadas en un mismo plano horizontal. Las coordenadas usadas para colocar la punta del electrodo de estimulación en el LC fueron P= 8.8 a 9.4 desde bregma, L= 0.8 a 1.1 y H= -5.5 a -6.3 desde la superficie del cerebro. La punta del microelectrodo de registro fué dirigida a la región del TO con un micromanipulador con pasos de 1 μ m; las coordenadas usadas fueron A= 3.5 a partir de bregma, L= 1.6 y H= -6 a -7.5 a partir de la superficie del cerebro.

h) VERIFICACION ELECTROFISIOLÓGICA DEL SITIO DE ESTIMULACION. Con el propósito de verificar si la punta del electrodo de estimulación se encontraba localizada en el LC se procedió a estimularlo durante 1 a 2 segundos con trenes de 20 a 30 Hz de pulsos cuadrados de 0.2 a 0.4 msec de duración y 400 a 800 μ amp de intensidad. Durante la estimulación del LC en esta forma se observó un aumento de la frecuencia respiratoria acompañado por una disminución de la amplitud del movimiento respiratorio (Ward y Gunn, 1976). Al suspender el estímulo frecuentemente se observe un movimiento inspiratorio corto y profundo. El ritmo respiratorio normal fué recuperado inmediatamente.

i) ESTIMULACION Y REGISTRO. Trenes de 10 a 60 Hz de 1 a 3 segundos de duración de pulsos cuadrados de 0.2 a 0.4 msec

de duración y de 400 a 300 uamp de intensidad se aplicaron al LC con un estimulador marca Grass S38 a través de una undad de aislamiento marca Grass PSIUG. Las señales bioeléctricas captadas por el microelectrodo de registro fueron alimentadas a un preamplificador de alta impedancia de entrada marca Grass H16. Como segunda etapa de amplificación se usó un amplificador marca Grass P511. En ocasiones se hizo pasar la señal por un sistema de capacitores con el fin de cancelar la interferencia producida por la red eléctrica del laboratorio. Las señales se proyectaron en la pantalla de memoria de un osciloscopio de rayos catódicos marca Tektronix 5103N. Ocasionalmente se tomaron fotografías con una cámara quimográfica marca Grass. Las señales también fueron grabadas en cinta magnética con un canal de una grabadora marca Ampex PR-500 para su posterior análisis. Con otro canal se grabó un pulso cuadrado que serviría de señal de disparo al lector analógico de una computadora durante el análisis de los datos. Con un tercer canal se grabó la narración hablada de los eventos ocurridos a lo largo del experimento.

j) VERIFICACION HISTOLOGICA DE LOS SITIOS DE REGISTRO Y DE ESTIMULACION. Al finalizar el registro se le inyectó al animal una dosis letal del anestésico usado. El sitio de estimulación fué destruido electrolíticamente con corriente directa de 1 mamp durante 1 segundo. El sitio registrado por la punta de la micropipeta fué marcado al depositar se el colorante "fast green" por el paso de corriente directa negativa de 40 uamp durante 10 minutos a través del microelectrodo. Ocasionalmente se dejó la pipeta en el cerebro para facilitar la localización del trayecto. La rata fué perfundida por vía intracardiaca con solución salina isotónica primero, e inmediatamente después con solución de formol al 10 %. El cerebro fué extraído y con un microtomo de congelación se obtuvieron secciones de 40 μ m de espesor de las regiones en las cuales estuvieron los electrodos. Los cortes histológi-

cos fueron montados en laminillas de vidrio y teñidos con rojo neutro. Los sitios de estimulación y de registro fueron verificados bajo microscopio. La identificación de las estructuras entre las cuales quedaron localizadas las puntas de los electrodos se efectuó con ayuda del Atlas estereotáxico del cerebro de la rata de Köning y Klippel (Köning y Klippel, 1963).

k) ANALISIS DE LOS DATOS. El análisis de las señales grabadas se llevó a cabo con una computadora analógico-digital FDI-11 equipada con un filtro discriminador de amplitudes. Los niveles del filtro discriminador fueron ajustados de tal suerte que a cada espiga correspondiese un pulso cuadrado proporcionado por el conversor analógico-digital. Esta operación se llevó a cabo con ayuda de un osciloscopio. Los datos fueron archivados en disco. La computadora fue programada para efectuar histogramas periestímulo con los datos biológicos que se le alimentaron. Un histograma periestímulo muestra la distribución de las espigas a lo largo del tiempo respecto y alrededor del instante en que se presenta el estímulo. Un pico en un histograma periestímulo representa un momento de preferencia de descarga relativo al instante del estímulo (Gerstein y Kiang, 1960). Así pues el histograma periestímulo es un estimador causa-efecto en el registro de actividad unitaria asociada a un estímulo. La duración del intervalo unidad de lectura de datos (bin), fue de 1000 milisegundos. La duración total de los barridos fue de 30 a 60 segundos. Se efectuaron sumas de 3 a 6 barridos para un mismo patrón de estimulación. Los histogramas se proyectaron en la pantalla de la computadora de donde se tomaron fotografías. La película tomada se leyó y los histogramas fueron dibujados.

IV.- RASTREO RETROGRADO DE PEROXIDASA DEL HABAÑO

a) ANIMALES. En los experimentos de rastreo retrógrado

do la peroxidasa del rábano se utilizaron 6 gatos y 7 ratas.

b) ANESTESIA Y PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg. La herida quirúrgica y los puntos de contacto con el aparato estereotáxico fueron anestesiados con pasta de xilocaína. La cabeza de los animales fué colocada en un aparato estereotáxico. El pelo de la cabeza fué rasurado. Una herida se efectuó en la piel con el propósito de dejar al descubierto el cráneo por encima de la región del TO. Se efectuó un trépano en el cráneo con una fresa dental montada en un motor manual. La duramadre subyacente fué cuidadosamente retirada con la punta de una aguja hipodérmica. El tejido cerebral expuesto se mantuvo húmedo con solución salina isotónica.

c) APLICACION DE LA PEROXIDASA. Se prepararon 15 μ l de una solución al 25 % de peroxidasa del rábano marca Sigma tipo VI (Adams, 1977) en solución amortiguadora de Tris con pH de 8.6. Micropipetas de vidrio con puntas de 25 a 40 μ m de diámetro fueron llenadas con la solución. La punta de la pipeta fué dirigida estereotáxicamente y verticalmente a la región del TO siguiendo las coordenadas estereotáxicas usadas en los experimentos electrorisiológicos. La PR fué aplicada microiontoforéticamente (Graybiel y Devor, 1974) con corriente directa positiva de 2 a 2.5 μ amp de intensidad durante 10 minutos, usando como terminal indiferente la oreja del animal. Suspendido el suministro de la corriente se dejó la pipeta intracerebralmente durante 10 minutos mas antes de ser retirada lentamente. Los bordes de la herida fueron unidos con grapas quirúrgicas.

d) PERFUSION. Se dieron 24 horas de sobrevida a los animales antes de ser sacrificados (Hedreon y McGrath, 1977). Se anestesió profundamente al animal y se le perfundió por vía intracardíaca. Primero se perfundió con solución lavadora e inmediatamente con solución fijadora usándose para cada solu

ción un volumen de 500 ml para ratas y de 1000 ml para gatos. La solución lavadora consistió en una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.3 con sacarosa como agente isosmótico que evitara la ruptura de la membrana celular. Un ml de xilocaina líquida al 1 % y 2 ml de heparina (20000 U.I.) en los primeros 250 ml de solución lavadora inyectados, provocaron respectivamente vasodilatación cerebral y evitaron la formación de coágulos que taparan los capilares. La solución fijadora consistió en una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.3 y sacarosa como agente isosmótico con 1.5 % de paraformaldehído como fijador y 2 % de glutaraldehído como estabilizador de la enzima PR (Adams, 1977). Las soluciones se inyectaron con una presión de 80 mm de Hg y a una velocidad de 500 ml durante 10 minutos.

e) PROCESAMIENTO DEL TEJIDO. Los cerebros fueron extraídos y guardados durante 12 horas a 4 °C para evitar la desactivación de la enzima y en solución lavadora para que el tejido se embebiera de la sacarosa contenida en ésta, evitándose así la destrucción del tejido al congelarse para su corte. Con un microtomo de congelación se obtuvieron cortes histológicos del cerebro de 60 μ m de espesor. Las secciones fueron procesadas para revelar la peroxidasa usándose como agentes cromóforos el tetrahidrocloreuro de diaminobenzidina (DAB) que da una coloración café (Mouta y cols., 1974), o bien benzidina (B) que da una coloración azul (Mesulan, 1976). Posteriormente las secciones se montaron con gelatina en laminillas de vidrio y se deshidrataron al aire. Para obtener un mejor contraste de las neuronas marcadas los cortes procesados con DAB se tiñeron con violeta de cresil y los procesados con B fueron teñidos con rojo neutro. A las laminillas se les colocó un cubreobjetos.

f) ANALISIS. El tejido fué analizado bajo un microscopio marca Olympus de dos oculares con iluminación de campo brillante y de campo obscuro. Los sitios en donde neuronas

marcadas se localizaron fueron señalados en dibujos histológicos. Una neurona marcada fué aceptada como positiva si cumplía con los siguientes requisitos (Winer, 1977): 1.- presencia de gránulos coloridos dentro de su soma y de las dendritas proximales al soma, 2.- buena definición del perfil del soma y 3.- que este perfil fuera semejante al presentado por las neuronas vecinas no marcadas. Ocasionalmente se fotografiaron algunas neuronas.

CAPITULO 3 RESULTADOS

I.- PRESENTACION

Se registró bipolarmente un potencial provocado en la región del TO en gatos, ocasionado por la estimulación del LC. Fueron efectuadas diversas maniobras que se han descrito en estudios realizados mediante esta técnica (Chang, 1959; Patton y Amassian, 1954).

La estimulación repetitiva del LC en ratas provocó supresión de la descarga de neuronas registradas en el TO. Las características de este efecto dependieron de los parámetros del tren de estimulación aplicado.

Neuronas marcadas en el LC se observaron después de la aplicación de PR en la región del TO en gatos y ratas.

II.- POTENCIALES PROVOCADOS

Bipolarmente se registraron diferencias de potencial eléctrico entre las capas del TO por estimulación eléctrica del LC con pulsos únicos. Generalmente se registró un potencial bifásico compuesto de una primera onda positiva (P) de 35 a 45 mseg de latencia al pico, seguida de una onda negativa (N) de 80 a 95 mseg de latencia. En raras ocasiones fué posible registrar un tercer componente positivo de 140 o más mseg de latencia. Ver la figura 1.

En la figura 2 se observa que conforme la punta inferior del electrodo de registro se llovó de la capa polimórfica del TO a la capa piramidal, la amplitud del potencial aumentó. La mayor amplitud se detectó cuando la punta inferior del electrodo de registro se encontraba en la parte superficial de la capa piramidal y la punta superior del electrodo se encontraba en la capa polimórfica. Amplitudes menores se obtuvieron

registrando entre la capa superficial y la capa piramidal. Un potencial similar fué registrado en el TG contralateral. El potencial fué registrado en gatos anestesiados, no paralizados y paralizados.

La figura 3 muestra que después de dos minutos de haber sometido al animal a asfixia no se observó el potencial. El registro del potencial se recuperó en cuanto se suministró aire. Pasados 15 minutos, la amplitud del potencial alcanzó un 50 % de su valor previo a la asfixia.

La figura 4 ilustra que conforme la intensidad de la corriente de estimulación fué aumentada, la amplitud de las ondas registradas fué mayor. Para observar las ondas de mayor latencia se requirió aplicar mayor corriente de estimulación.

La figura 5 muestra que la estimulación repetitiva del LG deprimió la amplitud de los componentes del potencial. Con una frecuencia de estimulación de 5 Hz ya no se registró el potencial. Los componentes de mayor latencia fueron los más sensibles a esta maniobra.

En la figura 6 se ilustra que la aplicación de pares de estímulos con diferentes lapsos de separación produjo interacción de la respuesta provocada por el estímulo condicional (EC) sobre la respuesta provocada por el estímulo de prueba (EP). Los efectos producidos por la interacción sobre los tres componentes no siguen un desarrollo temporal semejante. Un EP aplicado 450 msec o menos después de haberse aplicado un EC, evita que los componentes de la respuesta que correspondiera al EP, se desarrollen normalmente. Conforme se alarga el lapso entre el EC y el EP, las amplitudes de los componentes de la respuesta correspondiente al EP tienden a alcanzar la amplitud de los componentes homólogos de la respuesta provocada por el EC. Los componentes de mayor latencia fueron bloqueados más fácilmente. Ver la flecha a de la figura 6. Con un EP aplicado uno o más segundos después de haberse aplicado el EC, se obtuvieron componentes de mayor am-

plitud que los homólogos correspondientes al EC. Este fenómeno es mas notable en el componente de mayor latencia. Ver la flecha c de la figura 6.

En la figura 7 se muestra que la lesión electrolítica del sitio de registro ocasionada por paso de corriente directa por las puntas del electrodo, abolió el registro del potencial.

En la figura 8 se presenta una fotografía de un corte histológico con la lesión del sitio de estimulación del LC.

III.- ACTIVIDAD UNITARIA

Las unidades estudiadas presentaron una frecuencia de descarga de 1 a 10 espigas por segundo. Su ritmo no necesariamente era uniforme, pues a veces se observaba su descarga en forma de salvas con intervalos entre salva variables. Cerca de la neurona registrada fué frecuente detectar otras unidades también; ésto se lograba haciendo un registro multiunitario o moviendo el microelectrodo algunas micras en dirección dorsoventral. En general las unidades que respondieron a la estimulación fueron escasas. De hecho, en algunas penetraciones del microelectrodo fué imposible encontrar unidades que respondieran a la estimulación. Solamente se manipularon aquellas unidades que presentaron una descarga estable y cuya amplitud de descarga fué constante. En este tipo de unidades fué posible obtener la supresión de su descarga por estimulación repetitiva del LC. Ver la figura 9-A,B,C. Este efecto supresor fué sistemáticamente reproducible. Ver la figura 10.

Para determinar el momento en que se alcanzó el patrón de descarga basal se aplicó el siguiente criterio a los datos proporcionados por el histograma periestimulo. Se obtuvo el valor medio de descarga basal y de la correspondiente desviación estandar durante los 10 segundos que inmediatamente preceden al tren de estimulación. Se estableció como "valor lí

mite" el obtenido de restar el valor de una desviación estandar al valor medio de descarga basal. Se comparó el valor límite así obtenido con el valor de descarga correspondiente a cada uno de los segundos posteriores al tren. Cuando se encontró que durante tres segundos seguidos, el valor de descarga correspondiente a cada uno de esos segundos era igual o mayor al valor límite, entonces se consideró que el primero de esos tres segundos fué el momento en que se alcanzó la descarga basal. El tiempo transcurrido desde que se suspendió el tren de estimulación hasta el momento en que se alcanzó la descarga basal, se consideró como lapso de supresión. Una línea recta fué ajustada a los datos del histograma periestimulo con el método de mínimos cuadrados. La recta partió del momento en que se suspendió el tren de estimulación hasta el momento en que se alcanzó la descarga basal. La pendiente de la recta representa entonces la rapidez de recuperación de la descarga basal.

El lapso de supresión de la descarga dependió de los parámetros del tren de estimulación usado. En la figura 11, construida con los datos obtenidos de los histogramas presentados en la figura 9, se observa que con trenes de estimulación de frecuencia alta, tardó más la recuperación del patrón de descarga basal que con trenes de frecuencia baja.

En la misma figura 11 se observa que, la rapidez con la que se recuperó el patrón de descarga basal fué mayor después de un tren de estimulación de baja frecuencia y menor después de aplicado un tren de alta frecuencia.

Cuando se aplicaron frecuencias bajas de estimulación fué posible observar una depresión de la frecuencia de descarga durante el periodo que se mantuvo el estímulo. Este efecto se presenta en la figura 12.

La figura 13 muestra que aplicando la misma frecuencia de estimulación se obtuvo una mayor supresión de la descarga con trenes de estimulación de más duración que con trenes de

menor duración. Comparando las columnas A y B de la misma figura se observa que el efecto anterior es más notorio si la frecuencia del tren es mayor. A veces, inmediatamente después de suspendido el tren de estimulación, la unidad respondió con una súbita salva de espigas para suspender su actividad y recuperar paulatinamente su patrón normal de descarga. Ver la parte inferior de la columna B de la figura 13. En otras ocasiones, después del período de supresión, el inicio de la recuperación se marcó por una súbita salva seguida de una recuperación paulatina. Ver la parte inferior de la columna A de la figura 13.

El análisis de los cortes histológicos mostró que la punta del microelectrodo registró este tipo de unidades en la capa polilaminar o profunda del TC.

En la figura 14 se presentan fotografías de un típico sitio de registro y de estimulación.

No se detectaron efectos sobre la actividad de las unidades por estimulación del LC con pulsos únicos.

IV.- PEROXIDASA DEL RABANO

El propósito de los experimentos histológicos de rastreo retrógrado de la peroxidasa del rábano fué el de proporcionar apoyo a los resultados obtenidos con las técnicas electrofisiológicas.

La figura 15 muestra que después de aplicada unilateralmente la PR en la región del TC se encontraron neuronas marcadas ipsilateralmente en los núcleos de la banda diagonal, en la corteza prepiriforme, en la región preóptica, en el hipotálamo, en la zona incerta, en la formación reticular mesencefálica, en los núcleos del rafe y en el locus coeruleus. Se observaron algunas neuronas marcadas en el LC contralateral. La figura 16 ilustra un corte histológico de la región del TC donde se aplicó la PR; se presentan también fotografías de neuronas marcadas como se observarían con iluminación de campo obscuro.

V.- FIGURAS

Figura 1

Registro bipolar del potencial provocado en la región del TO por estimulación eléctrica del LC con pulsos únicos en gatos. Calibraciones: 100 useg y 150 uV.



Figura 2

Potencial provocado en el TO por estimulación del LC. Los potenciales que se muestran a la derecha fueron registrados en los sitios señalados con puntos negros en el dibujo histológico. Los puntos negros indican el lugar donde la punta inferior del electrodo estuvo localizada durante cada registro. El punto negro mas dorsal corresponde al potencial superior. La exploración se realizó con pasos de 200 μ m en dirección vertical dorsoventral. Tres trazos superpuestos fueron fotografiados. El cuadro insertado muestra como la amplitud del potencial cambia conforme el electrodo atraviesa las capas del TO. I= capa superficial; II= capa de células piramidales y III= capa poliédrica o profunda. Calibraciones: 40 msec y 150 μ V.

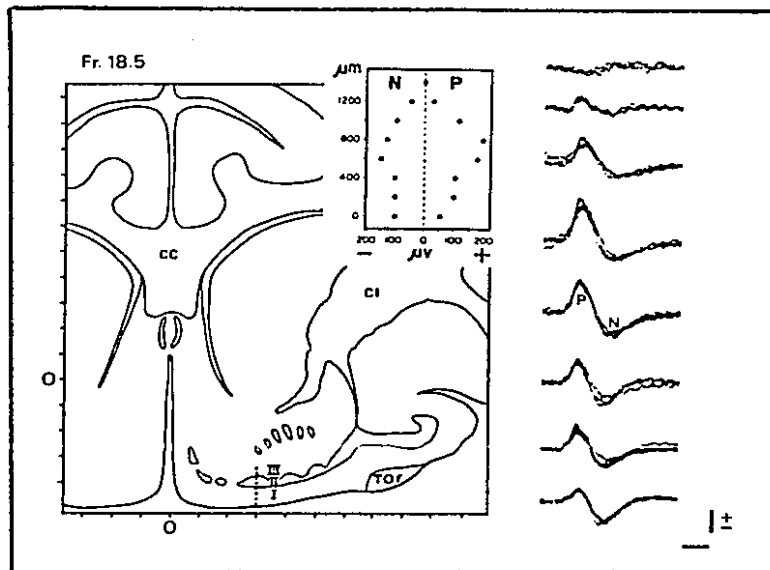


Figura 3

Efecto de someter a asfixia al gato sobre la amplitud del potencial provocado en el TO por estimulación del LC. El gato anestesiado, no paralizado tenía insertada en la tráquea una cánula de vidrio con una manguera de hule. La flecha A señala el momento en que se obstruyó la manguera de hule con una pinza; la amplitud del potencial corresponde al 100 %. La flecha B señala el instante en que se abrió la pinza; la amplitud del potencial fué cero. El animal no presentó movimientos respiratorios; su frecuencia cardiaca era sumamente baja. Para que hubiese intercambio de aire en los pulmones del gato, fué necesario oprimir y descomprimir rítmicamente su tórax con la mano. La flecha C señala el momento en que el animal recuperó la frecuencia cardiaca que tenía en el instante señalado por la flecha A. Ya entonces el animal mantenía sus movimientos respiratorios. La amplitud del potencial corresponde al 51 % de la amplitud correspondiente al instante señalado por la flecha A.

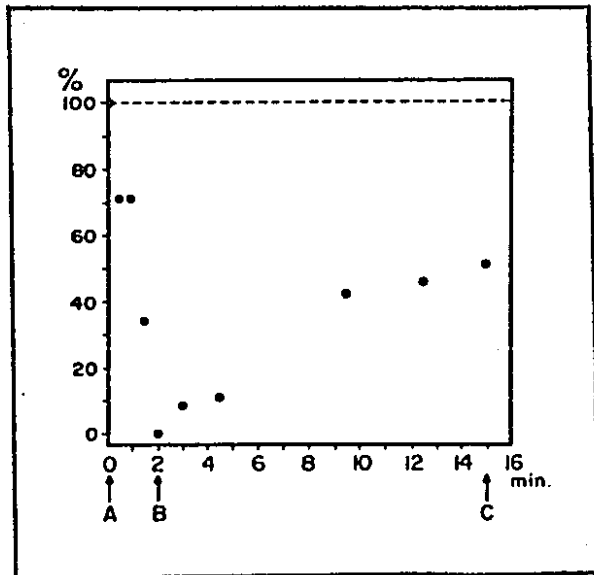


Figura 4

Potencial provocado en la región del TO por la aplicación de pulsos únicos al LC con diferentes intensidades de corriente. Los números a la izquierda de cada trazo indican el valor en mA de la corriente de estimulación aplicada. Calibración: 40 μseg y 150 μV .

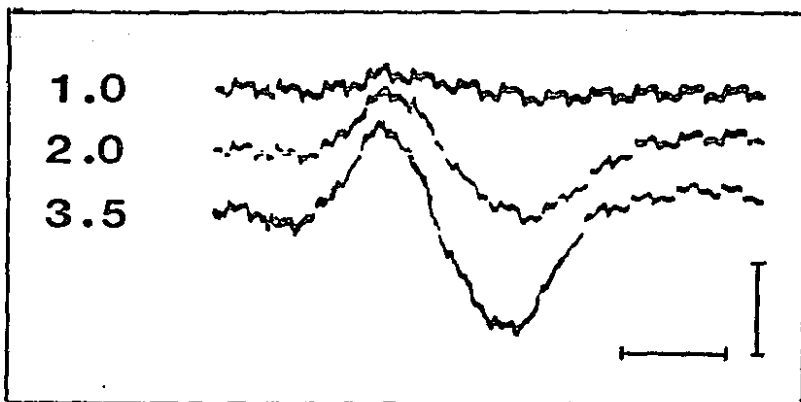


Figura 5

Efecto de la estimulación repetitiva del LC sobre los componentes del potencial provocado en la región del TC. Los números a la izquierda de cada trazo indican la frecuencia de estimulación aplicada. Se superpusieron de 5 a 15 barridos. El primer y último barrido fueron omitidos. Calibraciones: 40 μ seg y 150 μ V.

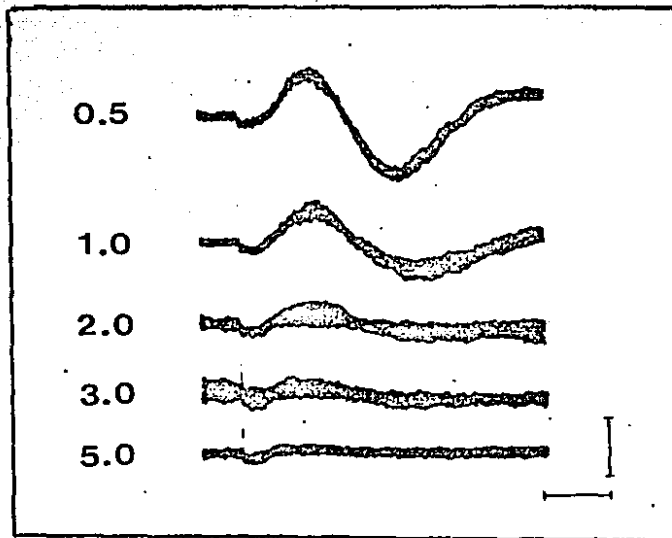


Figura 6

Interacción de la respuesta provocada por un estímulo condicio-
nante (EC) sobre la respuesta provocada por un estímulo de prue-
ba (EP). La parte A muestra 4 trazos superpuestos fotografía-
dos de la pantalla del osciloscopio. Durante el primer trazo
un EP fué aplicado después de transcurridos 450 mseg de haberse
aplicado un EC. Durante los 3 siguientes trazos se aplicaron
EP pasados 620, 820 y 1020 mseg de haberse aplicado el respec-
tivo EC. La parte B muestra la respuesta provocada por un EP
aplicado después de 2335 mseg de haberse aplicado el EC. En
las ordenadas de la gráfica C se señalan los porcentajes que
representan las amplitudes de los componentes de la respuesta
provocada por un EP respecto a las amplitudes de los componen-
tes homólogos de la respuesta provocada por un EC. En las abs-
cisas se representa el lapso transcurrido entre el EP y el EC.
El cuadro insertado en el extremo inferior derecho proporciona
la clave para cada uno de los componentes. La flecha a señala
que el tercer componente fué bloqueado mas facilmente por la in-
teracción a un lapso EC-EP de 900 mseg. La flecha b señala que
a un lapso EC-EP de 1200 mseg, los componentes de la respuesta
provocada por el EP igualaron la amplitud de los componentes de
la respuesta provocada por un EC. La flecha c señala que con
una separación de mas de 3 segundos entre el EP y el EC, se pu-
dieron obtener mayores amplitudes de componentes de la respues-
ta provocada por el EP respecto a las obtenidas con el EC. Ca-
libraciones: 200 mseg para A y 500 mseg para B; 75 uV.

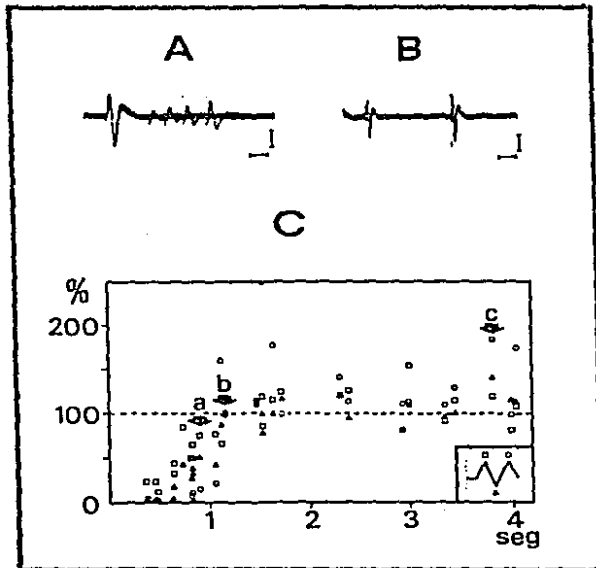


Figura 7

Efecto de la destrucción electrolítica del sitio de registro en el TO sobre el potencial provocado por estimulación del LC. La parte A muestra el potencial registrado bi-claramente provocado en el TO por la aplicación de un pulso único al LC. Después de efectuado el registro que se muestra en A se hizo pasar 5 amp de corriente directa entre ambas puntas del electrodo de registro durante 20 segundos. Se esperó 10 minutos y se aplicó al LC un pulso único de las mismas características que el usado para obtener A. La parte B muestra el registro obtenido. Calibraciones: 40 mseg y 150 μ V.

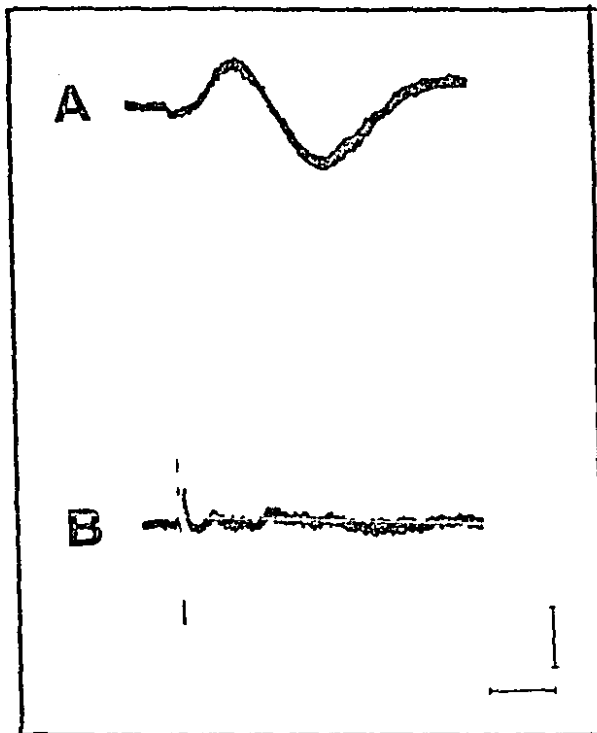


Figura 8

Sitio de estimulación del LC del gato. La flecha señala el LC contralateral al LC estimulado. Como se puede observar el LC estimulado fué destruido electrolíticamente. IV= cuarto ventrículo.

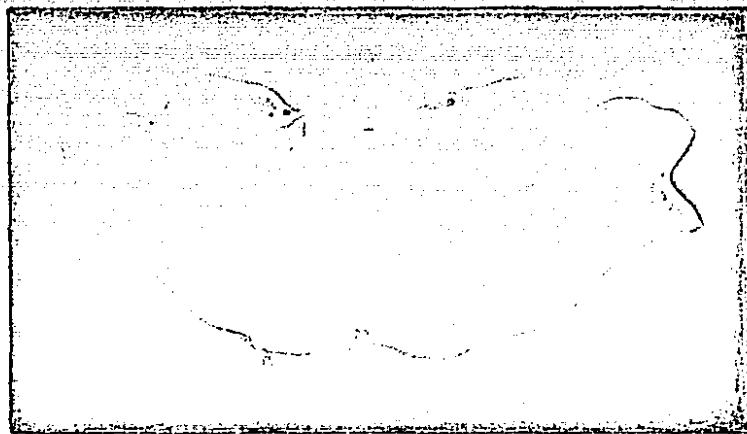


Figura 9

Actividad unitaria en el TO suprimida por la estimulación del LC. A, B y C representan histogramas periestímulo sumados. Las líneas negras verticales representan el número de espigas durante un segundo. Las barras sombreadas representan el tren de estimulación de 2 seg de duración con una frecuencia de 20, 40 y 60 Hz respectivamente. Debajo de cada histograma se hizo correspondér un trazo original como se observara en la pantalla del osciloscopio. La barra negra muestra el periodo de estimulación de 2 segundos.

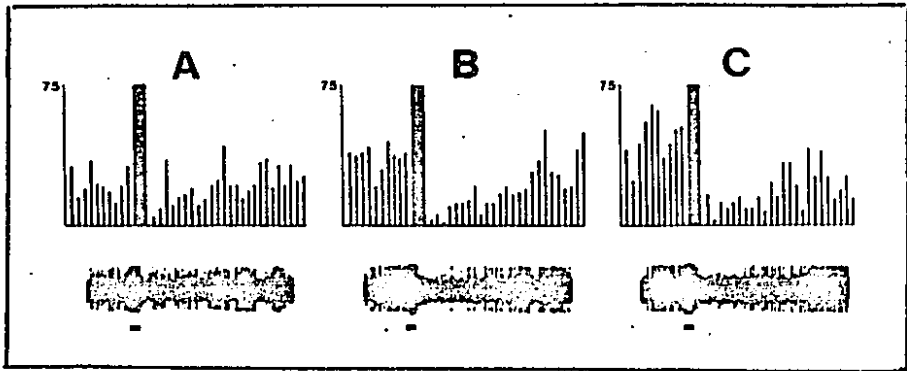


Figura 10

La supresión de la actividad de las unidades registradas en el TO por estimulación del LC fué sistemáticamente reproducible. A, B, C y D son registros sucesivos de la misma unidad fotografiados de la pantalla del osciloscopio. La barra negra horizontal señala que el tren de estimulación de 40 Hz duró 2 segundos. Un minuto transcurrió entre uno y otro trazo.

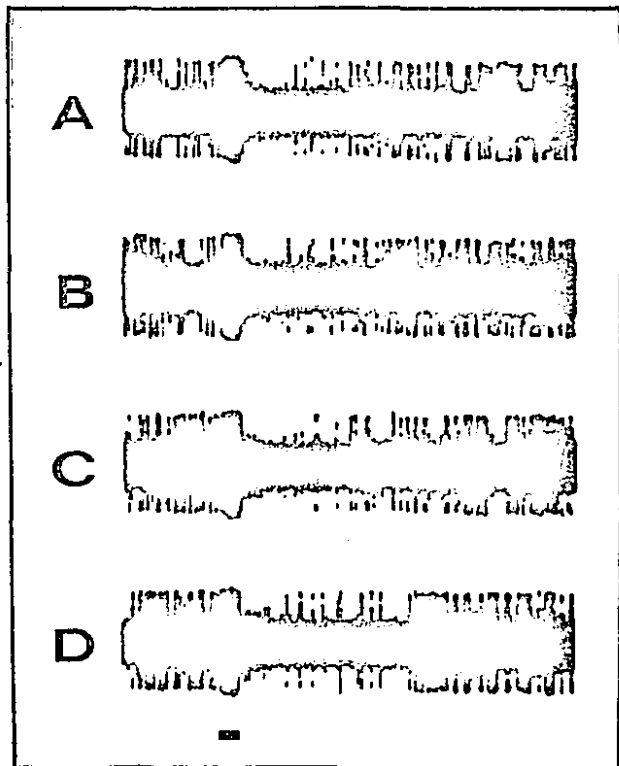


Figura 11

Dependencia del efecto supresor en la actividad unitaria registrada en el TO en función de la frecuencia del tren de estimulación aplicado al LC. La figura fué construida con los datos obtenidos del experimento presentado en la figura 9. En el eje de las abscisas se representa la frecuencia del tren de estimulación. La parte A muestra que el lapso transcurrido entre la suspensión del estímulo y el momento en que se recupera la descarga basal es dependiente de la frecuencia de estimulación. La parte B muestra que la rapidez con la que se recupera el patrón de descarga basal es dependiente de la frecuencia de estimulación.

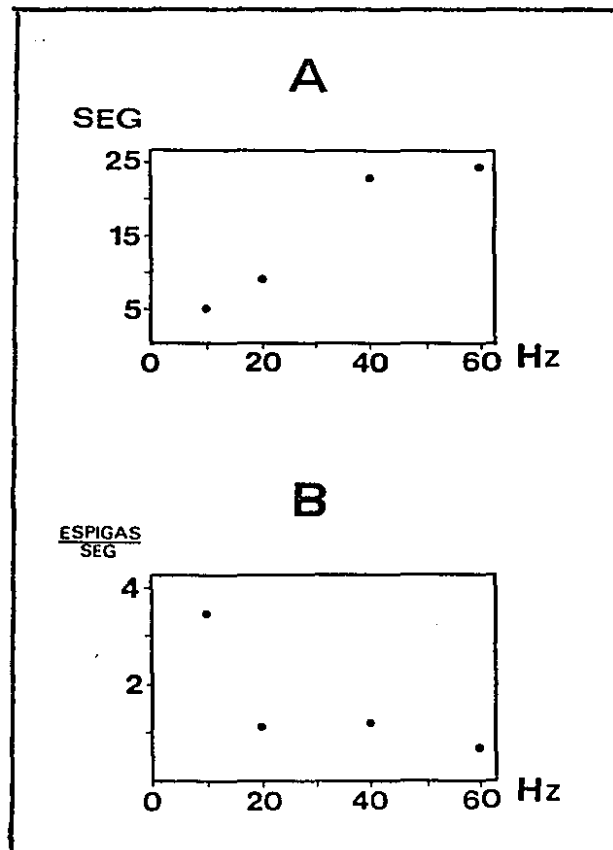


Figura 12

Depresión de la descarga de una unidad registrada en el TC durante la aplicación de un tren de estimulación de 10 Hz al LC.

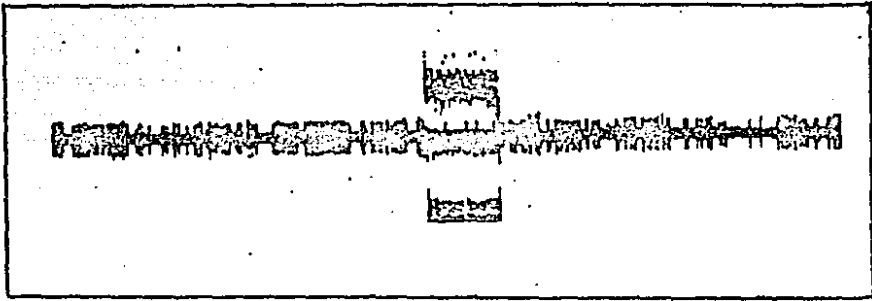


Figura 13

Histogramas periéstímulo de la descarga de una neurona registrada en el TC cuando se estimuló el LC. Las líneas negras verticales representan el número de espigas durante un segundo. Las barras sombreadas representan el tren de estimulación. Las columnas A y B muestran el efecto cuando la frecuencia del tren aplicado fué de 20 Hz y de 40 Hz respectivamente. De arriba a abajo la duración del tren aplicado fué de 1, 2 y 3 segundos.

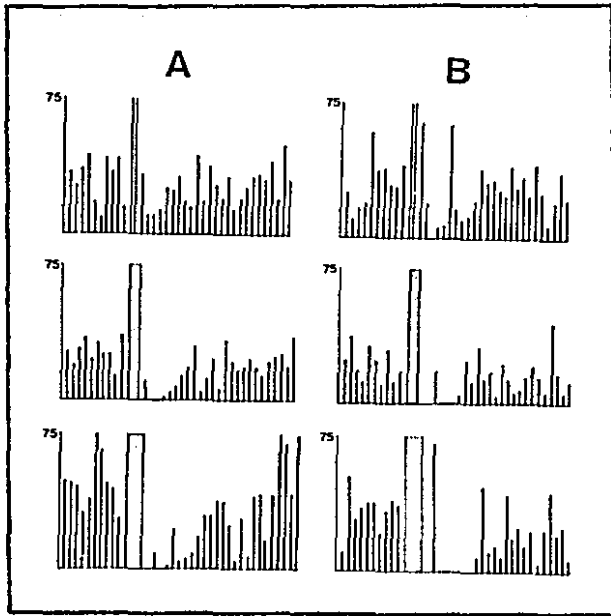


Figura 14

Sitio de estimulación del LC y de registro en el TO de ratas. La flecha de la parte A señala el LC contralateral al LC estimulado. El LC estimulado fué destruido electrolíticamente. La flecha de la parte B señala la región donde la punta de la micropipeta se localizó. CI= colículo inferior.

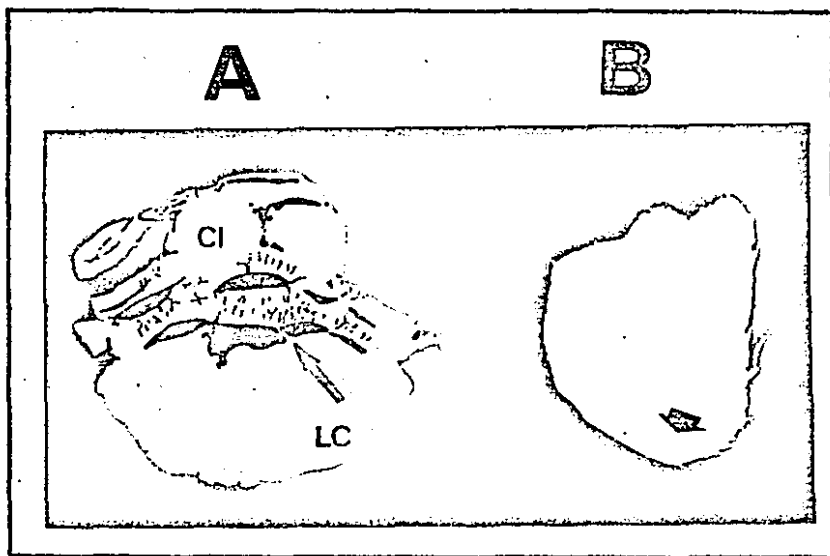


Figura 15

Dibujos de secciones coronales del cerebro de un gato donde se muestran los lugares que presentaron neuronas marcadas después de la aplicación de PR en la región del TC. La estrella negra señala el sitio de aplicación. Cada punto negro representa cinco o más neuronas marcadas.

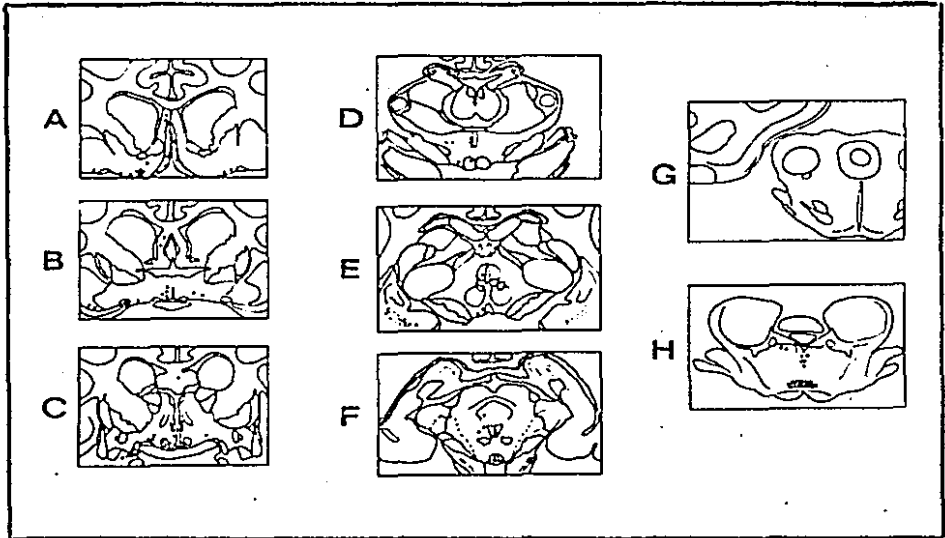
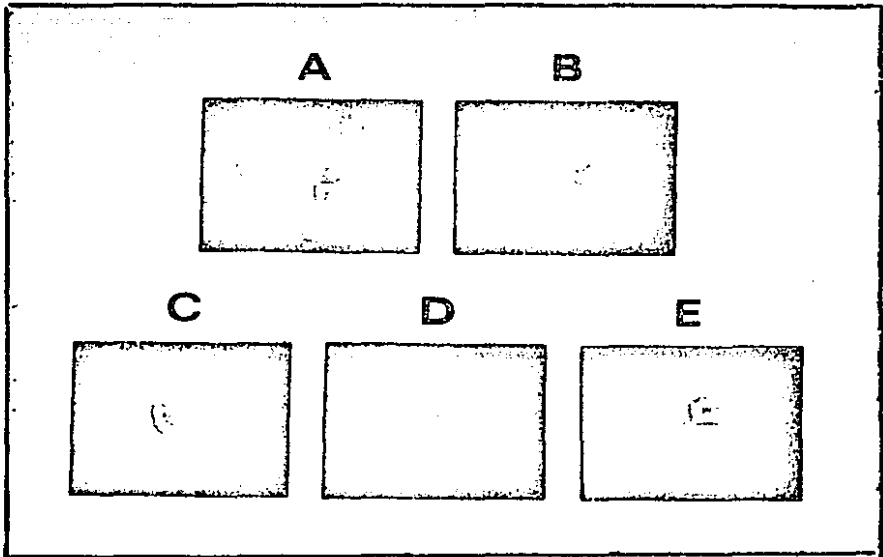


Figura 16

Fotografías tomadas con iluminación de campo oscuro de neuronas marcadas después de la aplicación de PR en el TO. La parte A muestra un típico sitio de aplicación de PR. Las partes B, C, D y E son neuronas marcadas en el hipotálamo lateral, núcleos paraventriculares, núcleos del rafe y locus coeruleus respectivamente.



CAPITULO 4 DISCUSION

I.- PRESENTACION

Las dos técnicas electrofisiológicas así como la técnica histológica proporcionaron resultados que apoyan el hecho de que las fibras provenientes del LC ejercen su influencia sobre neuronas del TO.

Los resultados proporcionados por la técnica de PR indican que fibras del LC inervan directamente la región del TO. Los resultados proporcionados por la técnica de registro de actividad unitaria en ratas indican que estas fibras ejercen su influencia en neuronas del TO. Los resultados proporcionados por la técnica de potenciales provocados en gatos indican que las fibras del LC desencadenan actividad transináptica en diversos elementos o grupos neuronales del TO.

Así pues, el TO como una estructura importante en el manejo de información olfatoria y el LC como un núcleo capaz de influir en forma generalizada en la actividad del encéfalo, quedan vinculados como moduladores del procesamiento y manejo de la información olfatoria.

II.- POTENCIALES PROVOCADOS

Se registraron diferencias de potencial eléctrico en la región del TO provocadas por la estimulación eléctrica del LC.

Con esta técnica no se puede determinar que clase de actividad transináptica representa el potencial registrado provocado por las fibras del LC en las neuronas del TO. Sin embargo es evidente que la estimulación del LC desencadena actividad eléctrica en el TO ya que la destrucción electrolítica de la región registrada abolió el registro del potencial.

Malliani registró un potencial provocado en regiones hipotálamicas de gatos por estimulación somática (Malliani y cols., 1965). Tomó como señales de que el potencial representa actividad local desencadenada por el estímulo, primero al hecho de que fué posible registrar dicho potencial bipolarmente y, segundo al hecho de que se registró actividad unitaria en relación fija con algunas ondas de la respuesta provocada. Para confirmar el postulado de que la respuesta registrada es de origen local y no es mera difusión de corriente eléctrica desde regiones distantes activas, lesionó electroquímicamente la región de registro. La respuesta bipolarmente registrada fué abolida. En aquel caso y en el presente, si la respuesta registrada bipolarmente hubiese sido ocasionada por difusión de corriente desde regiones activas lejanas, entonces el sitio lesionado hubiese funjido como un mero conductor y, el gradiente registrado hubiese permanecido inalterado. Debido a que la lesión acabó con los generadores de actividad ya no se registró el potencial.

Debido a que el TC es una estructura de gran tamaño, la destrucción electroquímica debió abarcar la región dominada por ambas puntas, para así abolir el registro. En estudios que involucraron esta misma estructura se ha manifestado la necesidad de ocasionar lesiones extensas para suprimir la actividad del TC (Guevara y cols., 1973).

Es conveniente recordar que el núcleo mesencefálico del nervio trigémino se encuentra localizado inmediatamente lateral al LC. La posible presencia de artefactos musculares en el registro del potencial fué descartada al registrarse el mismo tipo de actividad en animales paralizados. No se encontraron diferencias entre el potencial registrado en animales paralizados respecto al registrado en animales no paralizados.

Varios hechos sugieren que los componentes del potencial provocado representan la actividad generada sinápticamente en

diferentes elementos o poblaciones neuronales.

Para poder observar las ondas de mayor latencia fué necesario aplicar mayor corriente de estimulación que la requerida para detectar las ondas de menor latencia. Se podría pensar que las ondas tardías tienen su origen en poblaciones o elementos neurales de mayor umbral o cuya activación requiere de mecanismos más complejos.

El haber sometido a asfixia al animal ocasionó la pérdida del potencial en los dos primeros minutos. Chang ha puesto de manifiesto que conforme mayor es la naturaleza transináptica de un componente, aumenta la susceptibilidad a la anoxia (Chang, 1959).

Las ondas lentas fueron más sensibles al bloqueo por la presencia de un estímulo previo que las ondas de menor latencia. La recuperación de la amplitud de los componentes de la respuesta no fué paralela, lo que sugiere que tanto las propiedades de los elementos generadores de cada componente como el número de sinapsis involucradas, son diferentes.

La estimulación repetitiva ocasionó que los componentes de mayor latencia se perdieran antes que los de menor latencia conforme la frecuencia aplicada fué aumentada. Es conocido que la actividad generada sinápticamente puede ser bloqueada por aplicación de estímulos repetitivos. El grado de bloqueo por estimulación repetitiva parece aumentar con el aumento del número de sinapsis involucradas (Chang, 1959). Patton, registrando la respuesta provocada en la pirámide por estimulación cortical, logró bloquear por estimulación repetitiva la onda que representa actividad de interneuronas corticales la cual es producida sinápticamente (Patton y Amassian, 1954).

Los resultados obtenidos con las maniobras efectuadas sobre el potencial, sugieren que las ondas que lo componen sólo representan el resultado de actividad local desencadenada sinápticamente, más no representan actividad de fibras

de llegada. Es posible, sin embargo, hacer un cálculo sumamente burdo, como primera aproximación, para valorar la velocidad con la que las influencias del LC alcanzan al TO; para ésto no se toma en cuenta, por lo pronto, los retardos sinápticos que pudiesen estar presentes en la generación del potencial.

En un gato de 2.5 kg de peso, una distancia de aproximadamente 2 cm separa al LC del TO. La latencia al pico del componente más rápido del potencial fué de 35 msec. Así pues se tiene que la influencia del LC alcanzó al TO con una velocidad de 0.5 m/seg aproximadamente. Este valor concuerda aceptablemente con los valores reportados de velocidad de conducción de las fibras del LC de 0.4 a 0.6 m/seg (Takigawa y Mogenson, 1977; Palfers y Mogenson, 1976). Si se consideran en el cálculo anterior varios retardos sinápticos, se obtendría entonces, valores de velocidad de conducción mayores que estarían cercanos al límite superior del rango reportado. De cualquier forma, ésto podría tomarse como una corroboración de la delgadez de las fibras del LC (0.5 a 1.0 μ m) (Fuxe y cols., 1968).

El hecho de que el potencial provocado pueda ser registrado bilateralmente se explica por el gran número de decusaciones que las fibras del LC sufren en su ascenso hacia el telencéfalo. Se ha reportado que las fibras del LC se decusan en la comisura posterior, la decusación tegmental, la comisura supraóptica y la comisura anterior. Las fibras decusadas siguen un trayecto homólogo al de las fibras no decusadas (Jones y Moore, 1977; McBride y Sutin, 1976).

III.- ACTIVIDAD UNITARIA

La estimulación eléctrica repetitiva del LC ocasionó su presión de la descarga de neuronas localizadas en la capa polimérica del TO de ratas.

Se ha reportado que la estimulación eléctrica repetitiva del LC produce un fuerte efecto supresor sobre la descarga de neuronas en la corteza del cíngulo (Dillier y cols., 1978), en células purkinje de la corteza cerebelosa (Hoffer y cols., 1973), en células piramidales del hipocampo (Segal y Bloom, 1974) y en neuronas de la corteza sensorimotora (Phillis y Kostopoulos, 1977). Estos mismos reportes enfatizan que es necesario aplicar estimulación repetitiva al LC para obtener efectos supresores pronunciados. En el presente estudio fué posible obtener depresión de la frecuencia de descarga durante estimulación de baja frecuencia (10 Hz). Con aplicación de pulsos únicos no fué posible detectar cambio alguno en la frecuencia de descarga.

La respuesta supresora que presentaron las neuronas del TO registradas dependió de las características del estímulo aplicado al LC. El hecho de que la respuesta fué dependiente de la duración y de la frecuencia del tren de estimulación sugiere que el LC ejerce su influencia con un amplio rango de posibilidades.

Aún queda por demostrar el neurotransmisor involucrado en esta acción. Es probable que la noradrenalina sea el neurotransmisor, puesto que al ser aplicada esta sustancia isotópicamente en otras regiones inervadas por el LC, se simula la supresión de la descarga obtenida por la estimulación del LC (Dillier y cols., 1978; Hoffer y cols., 1973; Segal y Bloom, 1974).

IV.- PEROXIDASA DEL RABANO

El hecho de haberse observado neuronas marcadas en el LC después de la aplicación de FR en la región del TO indica que el LC inerva directamente la región del TO.

Es bien conocido que una sola neurona del LC puede inervar simultáneamente varias regiones encefálicas (Ungerstedt,

1971; Nakamura e Iwana, 1975). Es probable que los axones que inervan el TC envíen ramas a otras estructuras olfatorias como a los núcleos olfatorios anteriores y al propio BO (Guevara y cols., 1980).

V.- LA CAPA POLIMÓRFICA DEL TUBERCULO OLFATORIO

Es conveniente tener en cuenta tres hechos: El mayor gradiente de potencial obtenido con la técnica de potenciales provocados en gatos, fué registrado entre la capa polimórfica y la parte superficial de la capa piramidal del TC. Las unidades que respondieron suprimiendo su descarga debido a la estimulación del LC, fueron localizadas en la capa polimórfica del TC en ratas. La FR aplicada en la capa polimórfica del TC en gatos y ratas dió por resultado neuronas marcadas en el LC.

Scott reportó que neuronas localizadas en la capa polimórfica del TC, capaces de responder al estímulo olfatorio, fueron activadas antidrómicamente por estimulación del haz prosencefálico medial. Este mismo autor demostró que neuronas de la capa polimórfica del TC proyectan sus axones vía el haz prosencefálico medial hacia el núcleo gemini del hipotálamo y hacia el núcleo mediodorsal del tálamo (Scott y Chafin, 1975). Nakashima registró potenciales postsinápticos inhibitorios en células mitrales del BO ocasionados por la estimulación de las capas profundas del TC (Nakashima y cols., 1978). Neuronas marcadas con FR se han observado en la capa polimórfica del TC después de la aplicación de la enzima en el BO (Shafa y Meisumi, 1977; Dennis y Kerr, 1976).

Así pues, parece ser que la capa polimórfica o profunda del TC es importante en el procesamiento y manejo de la información olfatoria. Siendo su vía de intercomunicación el haz prosencefálico medial (Scott y Chafin, 1975; Millhouse, 1969; Valverde, 1963).

VI.- EL TUBERCULO OLFATORIO Y EL LOCUS CERULEUS COMO SISTEMAS MODULADORES

Para animales macrosmáticos como el gato y la rata, la información obtenida por medio de su sistema olfatorio es muy inportante para relacionarse con su medio ambiente.

El LC es una región de gran convergencia de información multisensorial y de aferencias provenientes de muchas otras estructuras (Igarashi y cols., 1979; Cedarbaum y Aghajanian, 1978; Clavier, 1979; Sakai y cols., 1977). Es probable que estas aferencias al LC puedan influir sobre el TO mediante las neuronas del LC.

Se ha remarcado que las proyecciones del LC pueden constituir una parte importante del sustrato morfológico del despertar cortical a través del sistema activador ascendente (Shimizu y cols., 1974; Lidbrink, 1974). Se ha enfatizado que la información que converge en el LC es ahí integrada y transmitida a lo largo de su extenso y difuso sistema de proyección en todo el cerebro, señalando de esta forma que un cambio en el estado de la organización ha sucedido, adjudicándosele de esta manera al LC el papel de mediador e integrador del despertar conductual (Cedarbaum y Aghajanian, 1978).

Se ha demostrado que el TO es una estructura involucrada en el control interbulbar de la actividad del bulbo olfatorio. Además se ha demostrado que el TO es una estructura que modula la excitabilidad del EO en los efectos generales de despertar a nivel del EO durante la vigilia (Gervais, 1979). Una lesión unilateral del TO en ratas tuvo como consecuencia un déficit sensorial contralateral y una respuesta exagerada ipsilateral a estímulos luminosos, táctiles y olfatorios (Kagan y cols., 1977).

El TO es una estructura privilegiada en cuanto que presenta una dual inervación monoaminérgica, puesto que recibe tanto axones noradrenérgicos como dopaminérgicos (Fallon y Moore, 1978). No sólo esto, sino que su inervación noradre-

nérgica proviene de dos fuentes diferentes; una proveniente del LC y la otra proveniente de acúmulos neuronales mas caudales al LC. Esta inervación dual noradrenérgica es una propiedad singular del TO entre las cortezas olfatorias (Fallon y Moore, 1978).

VII.- COMENTARIO FINAL

Debido a su peculiar inervación aferente y eferente y debido a la relación que guarda con el BO, el TO pudiera ser un eslabón importante que relacione sistemas generales de activación con el sistema olfatorio, modulando de esta forma el procesamiento de la información olfatoria.

CAPITULO 5

REFERENCIAS

- Adams, J.C. Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neuroscience* 2: 141-145, 1977.
- Aguilar-Baturoni, H.U., R. Guevara-Aguilar, H. Aréchiga and C. Alcocer-Cuarón. Hypothalamic influences on the electrical activity of the olfactory pathway. *Brain Res. Bull.* 1: 263-272, 1976.
- Alcocer-Cuarón, C. y H. Aréchiga. La regulación centrífuga de los receptores sensoriales. *Gac. Med. Mx.* 98(3): 379-392, 1968.
- Amaral, D.G. and H.M. Sinnamon. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Progress Neurobiol.* 9: 147-196, 1977.
- Andén, N.E., A. Dahlstrom, K. Fuxe, K. Larsson, L. Olson and U. Ungerstedt. Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon. *Acta physiol. scand.* 67: 313-326, 1966.
- Arduini, A. and G. Moruzzi. Sensory and thalamic synchronization in the olfactory bulb. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 5: 235-242, 1953.
- Broadwell, R.D. and D.M. Jacobowitz. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. III. The ipsilateral centrifugal fibers to the olfactory bulbar and retrobulbar formations. *J. Comp. Neur.* 170: 321-346, 1976.
- Cedarbaum, J.M. and G.K. Aghajanian. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J. Comp. Neur.* 178: 1-16, 1978.
- Clavier, R.M. Afferent projections to the self-stimulation regions of the dorsal pons, including the locus coeruleus, in the rat as demonstrated by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res. Bull.* 4: 497-504, 1979.
- Cragg, B.G. Centrifugal fibers to the retina and olfactory bulb, and composition of the supraoptic commissures in the rabbit. *Expl. Neurol.* 5: 405-427, 1962.
- Chang, H.T. The evoked potentials. In: J. Field, H.W. Magoun and V.E. Hall (editors). *Handbook of Physiology, Sec. I, Amer Physiol. Soc., Washington, I:* 299-313, 1959.
- Chernestski, K.E. Sympathetic enhancement of peripheral sensory input in the frog. *J. Neurophysiol.* 27: 493-515, 1964.
- Dennis, B.J. and D.I.B. Kerr. An evoked potential study of centripetal and centrifugal connections of the olfactory bulb in the cat. *Brain Res.* 11: 373-396, 1968.

- Dennis, B.J. and D.I.B. Kerr. Origins of olfactory bulb centrifugal fibres in the cat. *Brain Res.* 110: 593-600, 1976.
- Dillier, M., J. Laszlo, B. Muller, S.P. Koella and H.R. Olpe. Activation of an inhibitory noradrenergic pathway projecting from the locus coeruleus to the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 154: 61-68, 1978.
- Faiers, A.A. and G.J. Mogenson. Electrophysiological identification of neurons in locus coeruleus. *Exp. Neurol.* 53: 254-266, 1976.
- Fallon, J.H. and R.Y. Moore. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J. Comp. Neur.* 180: 533-544, 1978.
- Fuxe, E., B. Hamberger and T. Hokfelt. Distribution of noradrenaline nerve terminals in cortical areas of the rat. *Brain Res.* 8: 125-131, 1968.
- Galambos, R. and H. Davis. Inhibition of activity in single auditory nerve fibers by acoustic stimulation. *J. Neurophysiol.* 7: 287-303, 1944.
- Gerstein, G.L. and N. Y.S. Kiang. An approach to the quantitative analysis of electrophysiological data from single neurons. *Biophysic. J.* 1: 15-28, 1960.
- Gervais, R. Unilateral lesions of the olfactory tubercle modifying general arousal effects in the rat olfactory bulb. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 46: 665-674, 1979.
- Granit, R. Centrifugal and antidromic effects on ganglion cells of retina. *J. Neurophysiol.* 18: 388-411, 1955.
- Granit, R. The functional role of the muscle spindles, facts and hypothesis. *Brain* 98: 531-556, 1975.
- Graybiel, A.M. and M. Devor. A microelectrophoretic delivery technique for use with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 68: 167-173, 1974.
- Guevara-Aguilar, R., H.U. Aguilar-Baturoni, H. Aréchiga and C. Alcocer-Cuarón. Efferent evoked response in the olfactory pathway of the cat. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 34: 23-32, 1973.
- Guevara-Aguilar, R. and H.U. Aguilar-Baturoni. Olfactory pathway evoked potentials in response to hypothalamic stimulation. *Brain Res. Bull.* 3: 467-474, 1978.
- Guzmán-Flores, C., M.V. Alcaraz and A.G. Fernández. Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol. Inst. Est. Biol. Méx.* 16: 29-31, 1958.

- Haberly, L.B. and J.L. Price. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neur.* 178: 711-740, 1978.
- Hagamen, T.C., H.P. Greely, W.D. Hagamen and A.G. Reeves. Behavioral asymmetries following olfactory tubercle lesions in rats. *Brain Behav. Evol.* 14: 241-250, 1977.
- Hara, T.J., M. Freese and K.R. Scott. Spectral analysis of olfactory bulbar responses in rainbow trout. *Jap. J. Physiol.* 23: 325-333, 1973.
- Hedreen, J.C. and S. McGrath. Observations on labeling of neuronal cell bodies, axons and terminals after injection of horseradish peroxidase into rat brain. *J. Comp. Neur.* 176: 225-246, 1977.
- Heimer, L. Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *J. Anat.* 103: 413-432, 1968.
- Hernández-Peón, R., C. Guzmán-Flores y M. Alcaraz and A. Fernández-Guardiola. Habituation in the visual pathway. *Acta Neurol. Latinoamer.* 4: 121-129, 1958.
- Hernández-Peón, R. Centrifugal control of sensory inflow to the brain and sensory perception. *Acta Neurol. Latinoamer.* 5: 279-298, 1959.
- Hoffer, B.J., G.R. Siggins, A.P. Oliver and F.E. Bloom. Activation of the pathway from locus coeruleus to rat cerebellar purkinje neurons: pharmacological evidence of noradrenergic central inhibition. *J. pharmac. and expl. therap.* 184: 553-569, 1973.
- Igarashi, S., M. Sasa and S. Takaori. Convergence of sensory input from tooth pulp, optic chiasm and sciatic nerve onto locus coeruleus neurons in the rat. *Neuroscie. Letters* 12: 189-193, 1979.
- Jacobson, J.H. and G.F. Gestring. Centrifugal influences on the electroretinogram. *Ann. New York Academi Sci.* 74(2): 362-371, 1958.
- Jones, B.E. and R.Y. Moore. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res.* 127: 23-53, 1977.
- Kerr, D.I.B. and K.E. Hagbarth. An investigation of olfactory centrifugal fiber system. *J. Neurophysiol.* 18: 362-374, 1955.

- Kobayashi, R.M., M. Palkovits, I.J. Kopin and D.M. Jacobowitz. Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Res.* 77: 269-279, 1974.
- Konig, J.R.F. and R.A. Klippel. *The Rat Brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1963.
- La Vail, J.H. and La Vail, M.M. Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 176: 1416-1417, 1972.
- Lavin, A., C. Alcocer-Cuarón and R. Hernández-Peón. Centrifugal arousal in the olfactory bulb. *Science* 129: 332-333, 1959.
- Lidbrink, P. The effect of lesions of ascending noradrenaline pathways on sleep and waking in the rat. *Brain Res.* 74: 19-40, 1974.
- Lindvall, O. and A. Bjorklund. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain. *Acta physiol. scand. Suppl.* 412: 1-48, 1974.
- Loewenstein, W.R. Modulation of cutaneous mechanoreceptors by sympathetic stimulation. *J. Physiol.* 132: 40-60, 1956.
- Loizou, L.A. Projections of the nucleus locus coeruleus in the albino rat. *Brain Res.* 15: 563-566, 1969.
- Lynch, G., Ch. Gall, P. Mensah and C.W. Cotman. Horseradish peroxidase histochemistry: A new method for tracing efferent projections in the central nervous system. *Brain Res.* 65: 373-380, 1974.
- Malliani, A., P. Rudomín and A. Zanchetti. Contribution of local activity and electric spread to somatically evoked potentials in different areas of the hypothalamus. *Arch. Ital. Biol.* 103: 119-135, 1965.
- Mancia, M., J.D. Green and R. von Baumgarten. Reticular control of single neurons in the olfactory bulb. *Arch. ital. Biol.* 100: 463-475, 1962.
- McBride, R.L. and J. Sutin. Projections of the locus coeruleus and adjacent pontine tegmentum in the cat. *J. comp. Neurol.* 165: 265-284, 1976.
- Mesulam, M.M. The blue reaction product in horseradish peroxidase neuro-histochemistry: incubation parameters and visibility. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 1273-1280, 1976.
- Millhouse, O.E. A golgi study of the descending medial forebrain bundle. *Brain Res.* 15: 341-363, 1969.

- Nakamura, S. and K. Iwama. Antidromic activation of the rat locus coeruleus neurons from hippocampus, cerebral and cerebellar cortices. *Brain Res.* 99: 372-376, 1975.
- Nakashima, M., K. Mori and S.F. Takagi. Centrifugal influences on olfactory bulb activity in the rabbit. *Brain Res.* 154: 301-316, 1978.
- Nauta, H.J.W., M.B. Pritz and R.J. Lasek. Afferents to the rat caudoputamen studied with horseradish peroxidase. An evaluation of a retrograde neuroanatomical research method. *Brain Res.* 67: 219-238, 1974.
- Olson, L. and K. Fuxe. On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res.* 28: 165-171, 1971.
- Patton, H.D. and V.E. Amassian. Single and multiple-unit analysis of cortical stage of pyramidal tract activation. *J. Neurophysiol.* 17: 345-363, 1954.
- Phillis, J.W. and G.K. Kostopoulos. Activation of a noradrenergic pathway from the brain stem to rat cerebral cortex. *Gen. Pharmacol.* 8: 207-211, 1977.
- Pickles, J.O. and S.D. Comis. Role of centrifugal pathways to cochlear nucleus in detection of signals in noise. *J. Neurophysiol.* 36: 1131-1137, 1973.
- Price, J.L. and T.P.S. Powell. Certain observations on the olfactory pathway. *J. Anat.* 110: 105-126, 1971.
- Price, J.L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J. Comp. Neur.* 150: 87-108, 1973.
- Ramón y Cajal, S. Origen y terminación de las fibras nerviosas olfatorias. *Gac. Sanit. Barcelona*, 133-212, 1890.
- Rudomín, P., A. Malliani, M. Borlone and A. Zanchetti. Distribution of electrical responses to somatic stimuli in the diencephalon of the cat, with special reference to the hypothalamus. *Arch. Ital. Biol.* 103: 60-89, 1965.
- Sakai, K., M. Touret, D. Salvetti, L. Leger and M. Jouvet. Afferent projections to the cat locus coeruleus as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* 119: 21-41, 1977.
- Scott, J.W. and B.R. Chafin. Origin of olfactory projections to lateral hypothalamus and nuclei gemini of the rat. *Brain Res.* 88: 64-68, 1975.

- Segal, M., V. Pickel and F. Bloom. The projections of the nucleus locus coeruleus: an autoradiographic study. *Life Science* 13: 817-821, 1973.
- Segal, M. and F.E. Bloom. The action of norepinephrine in the rat hippocampus. II. Activation of the input pathway. *Brain Res.* 72: 99-114, 1974.
- Shafa, F. and E. Meisami. A horseradish peroxidase study of the origin of central projections to the rat olfaction bulb. *Brain Res.* 136: 355-359, 1977.
- Shimizu, N., S. Ohnishi, M. Tohyama and T. Maeda. Demonstration by Degeneration Silver method of the ascending projection from the locus coeruleus. *Exp. Brain Res.* 21: 181-192, 1974.
- Snider, R.S. and W.T. Niemer. A stereotaxic atlas of the cat brain. Chicago, IL: the University of Chicago Press, 1961.
- Swanson, L.W. and B.K. Hartman. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine- β -hydroxylase as a marker. *J. comp. Neurol.* 163: 467-506, 1975.
- Tagigawa, M. and G.J. Mogenson. A study of inputs to antidromically identified neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* 135: 217-230, 1977.
- Tasaki, K., Y. Tsukahara and S. Ito. A simple, direct and rapid method for filling microelectrodes. *Physiol. Behavior* 3: 1009-1010, 1968.
- Thomas, R.C. and V.J. Wilson. Precise localization of Renshaw cells with a new marking technique. *Nature* 206: 211-213, 1965.
- Ungerstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiol. Scand. Suppl.* 367: 1-48, 1971.
- Valverde, F. Studies on the forebrain of the mouse. Golgi observations. *J. Anat. Lond.* 97(2): 157-180, 1963.
- Ward, D.G. and C.G. Gunn. Locus coeruleus complex: elicitation of a pressor response and a brain stem region necessary for its occurrence. *Brain Res.* 107: 401-406, 1976.
- Winer, J.A. A review of the status of the horseradish peroxidase method in neuroanatomy. *Biobehavioral Reviews* 1: 45-54, 1977.
- Yamamoto, Ch. and K. Iwama. Central nervous regulation of electrical activity of the olfactory bulb in rabbits. *Proceedings of the Japan Academy* 36: 295-298, 1960.