

119
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EVIDENCIAS ANATOMICAS DE LAS CONEXIONES
ENTRE EL NUCLEO DEL RAFE DORSAL CON LA
CORTEZA PREFRONTAL Y EL NUCLEO CENTRAL
LATERAL DEL TALAMO EN EL DIENCEFALO
DE LA RATA. UN ESTUDIO HECHO CON
HRP - WG



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MA. MARTHA MARTINEZ SERVIN

FALLA DE ORIGEN



MEXICO. D. F.

1990



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A B R E V I A T U R A S

Ca	N. Caudado
Cl	N. Central Lateral
C.med.	N. Centralis Medialis
CM	N. Centro Mediano
CF	Corteza Prefrontal
DM	N. Dorsal Medial
FR	Formación Reticular
GL	N. Genuculado Lateral
GM	N. Genuculado Medial
HPT-WG	Feroidadza de Rabano Acoplada a Germen de Trigo.
I.Tal.	N. Intralaminares Talámicos
LC	Locus Coeruleus
LDTg	N. Laterodorsal del Tegmento
MnR	N. Nafe Mediano
NGC	N. Gigantocelularis
Fc	N. Paracentralis
Pf	N. Parafascicular
PGM	Substancia Gris Periacueductal
FnR	N. Nafe posterior
Rn	N. Rensiens
RD	N. Nafe Dorsal
Rt	N. Reticular Talámico
SN	Substancia nigra

SBC

Sustancia Gris Central

SNC

Sistema Nervioso Central

VA

N. Ventral Anterior

VL

N. Ventro-Lateral

VM

N. Ventro-Medial

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
CAPITULO I	
A) Anatomía del Talamo	5
B) Conexiones de los intralaminares talámicos con otras estructuras	7
C) Conexiones de los intralaminares talámicos con otros núcleos talámicos	12
D) La Corteza Prefrontal	13
E) Conexiones de los intralaminares talámicos con la Corteza	14
CAPITULO II	
A) Aspectos electrofisiológicos de los intralaminares talámicos y su relación con la corteza prefrontal	17
B) Los intralaminares talámicos en la transmisión nociceptiva 17	
-Definición del dolor	19
CAPITULO III	
MATERIAL Y METODOS	24
CAPITULO IV	
RESULTADOS	26
CAPITULO V	
DISCUSION	39
REFERENCIAS	44
APENDICE	50

R E S U M E N

En este trabajo se muestran las conexiones recíprocas entre el núcleo central lateral del teléncefalo (Cl) y la corteza prefrontal (CP) de la rata; y las conexiones con el núcleo dorsal (RD) y locus coeruleus (LC) que son evidencias anatómicas de una posible vía involucrada en la percepción del dolor.

Se utilizó la técnica histoquímica de la lectina aglutinina de germen de trigo acoplada con peroxidasa de rábano (HRF-WG) que es un trazador de transporte retrógrado y anterógrado.

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 300 g, a estas se les inyectó en el Cl (n=11) y la CP (n=8), un volumen de entre 30 y 40 μ l de HRF-WG. Los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (40 mg/kg i.p.).

Las inyecciones hicieron evidentes el marcado retrógrado en las células del Cl o de la CP, asimismo se observó en núcleos mesencefálicos: del RD, del rafe mediano (RMn), en LC, en las estructuras adyacentes.

Esta tesis aporta evidencias de las conexiones recíprocas entre la CP y Cl, y muestra las conexiones directas del RD y LC hacia el Cl y a la CP. Se sabe que el Cl y la CP procesan información nociceptiva, el hecho de que ambas regiones estén conectadas con el RD y el LC hace pensar que estas conexiones pueden estar involucradas en la modulación del dolor; es decir, pueden ser el sustrato morfológico de un mecanismo de analgesia en esta región.

INTRODUCCION

El dolor es una experiencia común en los humanos, ya que es un mecanismo de defensa que protege la integridad de un individuo cuando está en peligro. A la habilidad para responder a los estímulos aversivos medioambientales es una característica básica de los animales. Esta habilidad para detectar y reaccionar a aquellos estímulos que pueden comprometer su integridad, se le conoce con el término de "nocicepción" (63).

Los animales, tienen receptores que transducen del medio ambiente los estímulos aversivos (nociceptores). Esta información llega al sistema nervioso central y produce las respuestas de los efectores. Conforme se aumenta la complejidad de los organismos a lo largo de la escala filogenética, las reacciones y expresiones de la nocicepción son mas importantes.

Se ha definido el dolor en animales como: "la experiencia sensorial aversiva causada por un daño actual o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas de protección, que son el resultado del aprendizaje y que pueden modificar ciertas conductas propias de la especie, incluyendo la conducta social" (63).

En los humanos, la definición dada por la Asociación Internacional del Estudio del Dolor, enuncia que: "El dolor es la experiencia emocional y sensorial no placentera asociada con el daño del tejido actual y potencial" (63). El dolor es una experiencia que los individuos aprenden a expresar desde temprana edad.

Para muchos investigadores al interpretar las conductas animales asociadas a la nocicepción, (posturas, movimientos y vocalizaciones); lo hacen a partir de la experiencia humana, de

ahí que consideren a la nocicepción y al dolor como equivalentes (62).

Si estudiamos la nocicepción desde un enfoque filogenético, esta sensación, al igual que otras, vemos que alcanza gran perfección. Aumenta la capacidad de transmisión y procesamiento de la información en los vertebrados mediante el mecanismo de la evolución. Por ejemplo las aves rapaces tienen muy desarrollada la visión, por lo cual son capaces de ver a grandes distancias; también la visión nocturna de los felinos es otra forma del perfeccionamiento de un sentido.

En los protozoarios, observamos que los cambios en la aceleración, la inhibición de la locomoción, el cambio de dirección y de la forma del cuerpo son respuestas a los estímulos medioambientales aversivos (64). Se ha descrito que los phyla de invertebrados más "avanzados" (anélidos, artrópodos, equinodermos y moluscos) presentan comportamientos y respuestas relativamente más complejos a los factores biológicos y físicos ambientales, que aquellos que pertenecen a phyla más "simples". Este comportamiento y la capacidad de discriminación medioambientales, son compatibles con el desarrollo y la expresión de las conductas defensivas y de las respuestas a los estímulos nociceptivos (65).

En los vertebrados los mecanismos de nocicepción, se ha estudiado en anfibios, lampreas y lagartos, aunque la mayor cantidad de la información se ha obtenido de los estudios en mamíferos de laboratorio y de los estudios clínicos (44, 46, 48, 50).

En estas especies se ha descrito la existencia de nociceptores periféricos y de las vías en el SNC, que conducen y transmiten la información nociceptiva o sistema espino-talámico.

Este último tiene dos componentes el paleo y el neoespino-talámico (7,79,121). El sistema neoespino-talámico se ha estudiado ampliamente (5), en cambio el sistema paleoespino-talámico está menos estudiado, por la complejidad de sus conexiones, las características electrofisiológicas de sus respuestas. Por ejemplo, los axones de esta vía pueden terminar en los núcleos de la formación reticular, del tallo cerebral; también envía proyecciones a los núcleos mediales del tálamo, entre los que se encuentran los intralaminares talámicos (I.Tal). El tálamo envía sus axones a la corteza cerebral, con preferencia en las regiones de asociación como la corteza prefrontal (CP) (19,67,78).

Algunos autores proponen (7) la existencia de mecanismos de control o supresión de la transmisión nociceptiva, situados en los diferentes relevos de la vía espino-talámica. Se sabe que la estimulación eléctrica de ciertas regiones del tallo cerebral, en especial de los núcleos del rafe y de la formación reticular (FR) adyacente, producen analgesia, al bloquear la transmisión nociceptiva en las astas posteriores de la médula espinal. (46,74,95)

Otros autores sugieren la existencia de mecanismos análogos en el tálamo (6,7) y en la corteza cerebral (3). Recientemente se postuló una vía ascendente entre el núcleo del rafe dorsal (RD) y los I.Tal. que suprime la transmisión nociceptiva en el núcleo parafascicular talámico. (101,31,32)

En el laboratorio se estudian las interacciones entre el núcleo intralaminar central lateral talámico (CI), y la corteza prefrontal (CP) y su participación en la nocicepción. Se han reportado evidencias de la existencia de un sistema ascendente del

núcleos del café dorsal al CI y a la CF (101,29).

En trabajos previos (31) se mostró la existencia de un control cortical tónico facilitador que ejerce la CF sobre la actividad del CI espontánea y la provocada por la estimulación nociceptiva periférica (32).

En otro más reciente, se observó que la estimulación eléctrica del RD y la nociceptiva provocan respuestas convergentes en la CF y en el CI. Estos autores hicieron evidentes las conexiones directas entre el RD y el CI y el RD y la CF al estimular la CF y CL, registrar actividad ortodrómica y antidrómica en el RD (33).

En esta tesis se hace el correlato anatómico de las conexiones recíprocas entre la CF y CI y de las conexiones directas del RD con la CF y el CI. Estas conexiones participan en el procesamiento de la información nociceptiva y se han asociado con un mecanismo de control de la nocicepción.

El presente trabajo está dividido en 5 capítulos, el primero corresponde a la descripción anatómica de las estructuras que se estudian, el segundo capítulo trata los aspectos electrofisiológicos de esas mismas estructuras y su participación en la nocicepción, en el capítulo tres, se hace la descripción de la metodología empleada, el capítulo cuatro contiene los resultados obtenidos de esta investigación, y finalmente, el capítulo cinco está dedicado a la discusión de estos hallazgos.

CAPITULO I

A. - ANATOMIA DEL TALAMO

El talamo es un núcleo de relevo de la información sensorial y tiene una complicada intercomunicación con la neocorteca, que se establece por medio de regiones especializadas en la transmisión de impulsos nerviosos para cada modalidad sensorial. Las vías nerviosas provenientes de todos los sistemas sensoriales, con excepción del olfativo, llegan a los núcleos talámicos específicos, los que a su vez envían ésta información sensorial a la corteza cerebral; asu vez, cada región talámica recibe conexiones del area cortical correspondiente.

El talamo es una estructura neuronal simétrica en ambos hemisferios y está dividido en tres masa nucleares: la anterior, medial y lateral. La parte anterior está dividida por la lamina medular interna que se bifurca delimitando al grupo anterior.

En la fig.1 se muestra un esquema de la anatomía del tálamo.

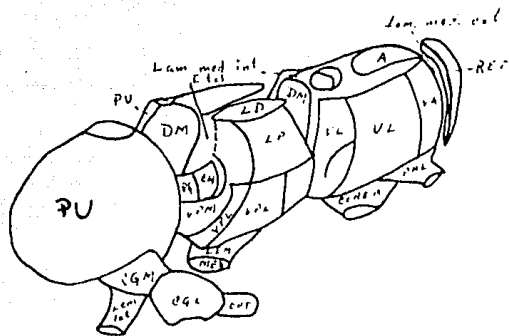


FIGURA 1. Esquema de los núcleos talámicos. A: núcleo anterior. CEREB: fibras del cerebro. CGL: cuerpo geniculado lateral. CGM: cuerpo geniculado medio. CM: núcleo centro medial. DM: núcleo dorsal medial. I.Tal: núcleos intralaminares. Lam. med. ext.: lámina medular externa. Lam. med. int.: lámina medular interna. LD: núcleo lateral dorsal. Lam. lat: lámina lateral. Lam. Med: lámina media. LP: núcleo lateral posterior. OPT: fibras del tracto óptico. PI: núcleo para fascicular. PAL: aferentes del pálido. PU: núcleo pulvinar. PV: núcleo paraventricular. RET: núcleo reticular. VA: núcleo ventral anterior. VL: núcleo ventral lateral. VPL: núcleo ventral postero-lateral y VPM: núcleo ventral postero-medial.

En el interior de la lámina medular interna se encuentran los grupos celulares que se han denominado núcleos intralaminares. (I.Tal.) entre los que están: el núcleo (ni) central lateral (Cl), n. paracentralis (nPe) y el núcleo centralis-medialis (nCmed) y el complejo centro mediano parafascicular (CM-PF) (59).

A lo largo de la escala filogenética existen grandes variaciones en cuanto a la presencia y tamaño de los núcleos intralaminares talámicos (I.Tal.), por ejemplo el CM en roedores y otros mamíferos es pequeño y tiene mayor tamaño en primates incluyendo al hombre. En los primates, este núcleo consiste en una región ventrolateral de células pequeñas y otra dorsal medial de células grandes (61,102). Los I.Tal. forman parte del sistema talámico difuso. Este sistema se ha caracterizado por proyectar de forma inespecífica a una amplia zona de la neocorteza, lo que le ha dado el nombre de sistema inespecífico.

La información neural que llega al tálamo puede hacer relevó en dos tipos de neuronas, las principales y las intrínsecas. Las neuronas principales son aquellas células que envían sus axones fuera de los núcleos talámicos, éstas son neuronas multipolares con 4-6 arborizaciones dendríticas (102), y aunque varían en cada núcleo, sus axones pueden tener colaterales. Las fibras recurrentes axónicas de estas neuronas parecen estar poco desarrolladas (119). Además, sus axones parecen ser amielínicos (117), ya que se les ha reportado una velocidad de conducción de entre 0.5 y 3.5 m/s (85,120).

Las neuronas intrínsecas o interneuronas son células de axón corto o neuronas golgi tipo II (113) en algunas especies de ratones se han descrito como bipolares, miden de 17 a 20 μ m de

diámetro y llevan de 4 a 6 columnas de prolongadas dendritas (117), en la membrana de sus dendritas se observan espinas o estructuras pleomorfas que usualmente tienen de 5 a 30 μ m de longitud.

En esta tesis se resalta el papel del núcleo Cl y sus conexiones con la corteza prefrontal y con el complejo del rafe.

B.- CONEXIONES DE LOS I.TAL. CON OTRAS ESTRUCTURAS

A finales de los sesentas existían numerosas evidencias de una vía espinoreticular y algunas que mostraban conexiones espino-reticulo-talámicas. Pocos estudios se habían encaminado a caracterizar las relaciones de las fibras espinoreticulares con las neuronas de la formación reticular (FR) que proyectaban al tálamo.

En este sentido, Bowsher y col. (22) mostraron que neuronas del núcleo gigantocelularis (NGC) de la FR eran activadas por estimulación del cuadrante anterolateral de la médula espinal y que además existía una activación subsecuente en el CM.

Feschansky y Besson (94) confirmaron estos hallazgos con técnicas de marcado anterógrado y retrógrado estableciendo proyecciones del NGC al CM. La formación reticular mesencefálica especialmente el campo central tegmental proyecta profusamente a los I.Tal. (118). Por su parte Sternade (116) estimuló el complejo CM-FR y el Cl y obtuvo respuestas antidrómicas en la FR mesencefálica y en la pontina pero no en ambas a la vez. Estos estudios establecen que los I.Tal reciben aferencias de la FR.

Los I.Tal reciben las aferencias espinales a lo largo de

las vías espinotalámicas (17,20,121) y de la vía espinoreticulotalámica que termina en el CI (55,91). También llegan a estos núcleos terminaciones del área prefrontal y tálamo mesencefálica en los roedores (112). En los primates y el gato, del cerebelo ascienden fibras que terminan en el CM y CI (53,76).

Existen aferencias a los I.Tal. originados en los ganglios basales, que provienen de la sustancia negra y terminan en el Pf de la rata (15), en el CI, centralis medialis y Pc del gato (53).

Cabe hacer especial énfasis en las aferencias que llegan del CI y CF originadas en los núcleos del rafe (en particular con el rafe dorsal), ya que son el objeto de estudio de esta tesis.

El núcleo del rafe del tallo cerebral de los vertebrados consiste de un grupo de células adyacentes a la línea media en el mesencéfalo, puente y bulbo. Este núcleo se considera actualmente parte de la FR y se divide en B núcleos, los cuales son: el núcleo del rafe pálido, obscuro y magnus; que se localizan en el bulbo raquídeo, el núcleo del rafe pontis, el central posterior en el puente; y el núcleo del rafe dorsal, linear caudal rostral que se localizan en el mesencéfalo (18).

Es característico que los núcleos del rafe tengan una gran cantidad de neuronas serotoninérgicas aunque no se ha mostrado que todas contengan este neurotransmisor (35).

Recientemente se describieron conexiones directas entre los núcleos del rafe y el tálamo (73,29). Un análisis que se hizo de las conexiones del rafe con varios núcleos talámicos, indicó que estas conexiones están relacionadas con varios aspectos de la transmisión somática, en particular con la transmisión del dolor

(98,46,50,51,76)

Estudios electrofisiológicos varios núcleos del rafe se observa que la actividad de muchas neuronas podía afectarse por estimulación somática nociva y/o inocua (82,10,50,51,107). Por otra parte, la estimulación eléctrica del núcleo del rafe puede inducir efectos analgésicos en varias pruebas de comportamiento (106,100,45). Las lesiones electrolíticas de varios núcleos del rafe modifican las respuestas a los estímulos nocivos e inocuos o a ambos (77,72).

En otros estudios, se ha asociado esta acción del rafe con procesos somatosensoriales, y con el control de la transmisión somática en el asta dorsal de la médula espinal (18,103).

Faschanski y Besson (93) en un estudio hecho en la rata confirmaron las evidencias encontradas en el gato de que varios núcleos del rafe proyectan a diferentes áreas del diencefalo. Mostraron que el núcleo RD y Rm proyectan al tálamo dorsal, medial e intralaminar hay una escasa pero significativa proyección del FMg a los intralaminares.

Por otra parte Condes-Lara (21,22) recientemente confirma que el núcleo del RD tiene conexiones con el CI y la CF, lo anterior se demostró mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas, al estimular la CF y CI y registrar actividad antidrómica y ortodrómica en células de RD. Estas evidencias muestran una vía ascendente entre el RD hacia el CI y CF.

Los estudios anteriores señalan la complejidad de las conexiones de los I.Tal. con la corteza y con otras estructuras subcorticales como los núcleos del rafe. Lo que nos da idea de la complejidad funcional de este sistema.

C. - CONEXIONES DE LOS I.TAL CON OTROS NÚCLEOS TALÁMICOS

Se han documentado las conexiones intratalámicas entre el núcleo reticular talámico y el tálamo ventral. El reticular talámico recibe colaterales de las fibras de paso talamocorticales y cortico-talámicas. La mayor parte de estas conexiones se dirigen al tálamo dorsal (Sg, 111). Se ha descrito que una gran parte de la población neuronal reticular es gabaérgica y se presume que son neuronas inhibitorias (116).

Los estudios anatómicos de Scheibel y Scheibel (112) reportan que debido a la gran ramificación de los axones del sistema I.Tal se establecen cadenas de comunicación entre los diferentes núcleos de este sistema. Se han visto proyecciones a los núcleos Va, VL y Rt. Las ramificaciones largas cruzan la línea media y establecen relaciones sinápticas con los núcleos inespecíficos contralaterales. Este tipo de proyecciones comisurales son muy importantes en los roedores pero parece disminuir su importancia en los primates y el hombre.

D. - LA CORTEZA PREFRONTAL

En los mamíferos al polo anterior de la corteza cerebral de la rata, ha sido denominada de diversas formas. La región cortical que aquí interesa forma parte de la corteza frontal 2 de Zilles (125), de la corteza precentral medial (65.6s.) En otros mamíferos, gato, perro, primates y en el hombre frecuentemente se le denomina de diversas formas: corteza frontal granulosa o bien corteza de asociación frontal. En este trabajo se asume que la corteza prefrontal es el área cortical de proyección primaria del núcleo medial dorsal del tálamo. Estas conexiones pueden

encontrarse en las diferentes especies de mamíferos estudiados.

La corteza prefrontal aumenta su volumen a lo largo de la escala filogenética. Esta poco desarrollada en roedores y es más aparente en los primates, en los cuales esta parte cortical fue denominado por Brodman "region frontalis" (44). En el hombre adquiere su mayor tamaño lo cual es una característica de mayor evolución de esta especie (44,27).

Diversos estudios morfológicos de la CP han mostrado que reciben aferencias del diencefalo (3,104,105,60,34,97) del mesencefalo (74), del sistema límbico (74,47,86) y de otras áreas de la neocorteza (47,61)

Las conexiones provenientes del diencefalo, se originan principalmente del núcleo medial dorsal del tálamo (35,89). Otros núcleos talámicos que proyectan sus axones a la corteza prefrontal son: el ventral anterior y los I.Tal (87,89). Se ha observado que las proyecciones tálamo-corteza prefrontal tienen una distribución topológica, es decir, están organizadas en series de columnas paralelas y verticales que atraviesan la lamina medular interna del mono (64).

En los primates la corteza prefrontal es homotópica y claramente laminada, ya que la capa granular interna o capa IV se encuentra bien desarrollada, esta característica distingue a la corteza prefrontal del resto de la corteza frontal. La capa IV contiene células piramidales pequeñas, pero primordialmente está constituida por células granulosas y neuronas Golgi tipo II de gran polimorfismo. Es común que las células granulosas y las estrelladas tengan dendritas cortas que se ramifican cerca del soma y forman un campo dendrítico, además, sus axones son cortos

por los que permanecen en la corteza y forman oleos que rodean a las células piramidales (112). Se ha observado que en la región prefrontal, al igual que en otras regiones de la isocorteza aparecen los agregados neuronales verticales, algunos de estos son pleros de las terminaciones aferentes lamínicas (111), otros son las redes formadas por las dendritas apicales que ascienden a las capas corticales superficiales y fibras córtico-corticales (113).

Las conexiones eferentes de la corteza prefrontal pueden dividirse en cuatro grupos: al diencefalo (5,13,66), a las formaciones límbicas corticales y subcorticales, a las áreas neocorticales sensoriales (47,61,90) y a los ganglios basales y otras estructuras implicadas en el control motor, incluyendo el control del movimiento de los ojos (36,86).

El principal núcleo talámico que recibe las aferencias de esta corteza es el medial dorsal (107). También se han reportado aferencias corticales a los núcleos ventrales e l.Tal (89,95).

La corteza prefrontal procesa información sensorial de diversas modalidades y sus neuronas pueden presentar respuestas a una o varias modalidades sensoriales (90).

E.- CONEXIONES DE LOS NUCLEOS INTRALÍMBICOS CON LA CORTEZA

En este inciso se abordarán las interacciones (Tal. con la corteza prefrontal (CPE) de la rata, que forman parte del sistema talamo-cortical inespecífico.

Las conexiones recíprocas entre el tálamo y la corteza fueron inicialmente bosquejadas por Cajal, aunque no fue sino hasta la aparición de los trabajos de Lorente de Nó cuando se prestó

atención a su citoarquitectura y se empezó a detallar la organización de estas conexiones.

Los trabajos de Dempsey y Morison (57,58) y Morison y Dempsey (63,64) y Jasper (59) señalaron con medios electrofisiológicos la existencia de un sistema talamo-cortical. Los estudios de Nauta y Whitlock (89), Powell y Cowan (97) y de Nashold y col. (85) presentaron evidencias anatómicas de que, la porción anterior de los I.Tal. proyectaba a la corteza.

Molinari y col. (81) reportaron en un estudio con peroxidasa de rabano acoplada con germen de trigo (HRP-WG) eferentes corticales a los I.Tal en ratas y gatos. Al inyectar peroxidasa en la corteza motora de la rata observaron células marcadas anterógradamente en el talamo ipsilateral, células marcadas retrógradamente en el talamo ipsi y contralateral. El marcado anterógrado contralateral fue menos profuso que el ipsilateral y se distribuyó en los I.Tal. (Cl, Pf), n. ventro mediano (VM), n. ventrolateral (VL) y el complejo posterior.

Esta misma técnica aplicada en el gato, reveló terminales marcadas anterógradamente en los I.Tal., VA, VM, VL, del lado contralateral. Los I.Tal. presentaron mayor número de terminales marcadas aunque en menor grado que aquellas observadas en la rata. Estos resultados indican que eferentes corticales motoras proyectan más densamente al talamo contralateral en la rata que en el gato. En el gato estas fibras se distribuyen principalmente en los I.Tal. contralaterales; mientras que en la rata, también hay proyecciones profusas al complejo ventral.

Condés-Lana (29) confirma las proyecciones bidireccionales del Cl a la corteza prefrontal de la rata utilizando técnicas de

marcado con HRF-WG y técnicas electrofisiológicas de potenciales antidrónicos que relacionan esta región cortical con los I.Tal.

Recientemente este mismo autor mostró la existencia de un control cortical tónico facilitador que ejerce la CP sobre la actividad del CI espontánea y la provocada por la estimulación nociceptiva periférica (24)

CAPITULO II

A.- ASPECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LOS I.Tal. Y SU RELACION CON LA CORTEZA PREFRONTAL

Las células de estos núcleos se activan por estimulación sensorial de diversas modalidades y sus campos sensoriales carecen de organización somatotópica, lo que hace que sus respuestas sean heterosensoriales y heterotópicas (67). Los estímulos somáticos adecuados para provocar respuestas de los I.Tal., deben aplicarse de forma rápida y breve, por presión súbita, golpeteo o piquetes.

Además las neuronas de los I.Tal. tienen un ciclo lento en la recuperación de su actividad celular. Es decir, al aplicar una serie de estímulos con una frecuencia mayor de 3 Hz. las neuronas solamente responden al primero y no a los siguientes. La interpretación de estos resultados sugiere un efecto inhibitorio en el tálamo.

La aplicación de estímulos nociceptivos produce respuestas en el tálamo medial del mono (24), gato (40) y rata (46).

Peschanski y col. (95) han observado en la rata que las neuronas que respondían a la estimulación nociceptiva se encuentran situadas en la región dorsal y rostral de los I.Tal. Los estímulos nocivos e inoivos se transmiten a estas células por la vía espino-retículo-talámica que es parte del sistema medial.

Cabe recalcar las proyecciones recíprocas del Cl con la corteza prefrontal de la rata, ya que son el objetivo de estudio de este trabajo. Estas interacciones fueron descritas mediante la

aplicación de HRF-WS. Estas proyecciones forman un circuito talamo-cortical, y se les atribuye un papel funcional importante en la actividad espontánea del CI y probablemente también en la actividad cortical (5,7).

Trabajos previos en el laboratorio hicieron evidente que la corteza prefrontal ejerce un control tónico facilitador sobre la actividad de los I.Tal., la espontánea y la provocada por estimulación somática (6,34). En una publicación más reciente (26) se sugiere que este control cortical puede estar relacionado con la transmisión de la información nociceptiva (28).

En otros trabajos se estimuló la CF y se disminuyeron en el talamo media y mesencefalo las respuestas provocadas por la estimulación nociceptiva. Otro estudio conductual muestra que la estimulación de la CF incrementa la latencia de respuestas a la estimulación nociceptiva.

Estas evidencias sugieren que las interacciones del CI y CF participan en el procesamiento de la información nociceptiva y probablemente en los mecanismos de supresión de esta.

B. - LOS I. TAL EN LA TRANSICION NOCICEPTIVA

Las columnas anterolaterales han sido consideradas como las vías clásicas que transmiten el dolor y la temperatura. Estas vías tienen su origen en las neuronas de la lámina IV, V, VI y terminan en la FR y en el tálamo, en los núcleos ventral posterior y en los I. Tal. Estos reciben aferencias de las vías del haz espinotalámico y del espino-retículo-talámico (94). La primera región talámica que se mostró recibía impulsos nerviosos transmitidos a través de las columnas anterolaterales fue el CM-Pf de los I. Tal. lo que llevó a considerar que dicho complejo era un centro para la apreciación del dolor.

En el núcleo reticularis gigantocellularis (NGC), es relieve medular de esta vía espino-retículo-talámica se han observado neuronas que responden a estímulos nocivos (16,21,25). Asimismo, se han observado neuronas que responden a este tipo de estimulación en varias regiones del tálamo y se ha sugerido que algunas de las respuestas están relacionadas con la vía espino-retículo-talámica, especialmente la región posterior de los I. tal. (16).

Se han identificado dos tipos de dolor: uno rápido, localizado y breve; y otro lento, difuso y duradero. Estas diferencias se atribuyen a la velocidad de conducción de las fibras A delta y C respectivamente (120).

La distinción anatómica de las vías espino-talámica y espino-retículo-talámica parece tener gran importancia funcional. Así, la vía espinotalámica directa ha sido relacionada con el dolor rápido, breve y localizado y la vía espino-retículo-talámica

con el dolor lento, difuso y duradero.

Se ha mostrado en los I.Tal. (75) que las neuronas que responden a estímulos nociceptivos no codifican tan claramente los parámetros del estímulo, en particular la intensidad, y presentan umbrales de respuesta a los estímulos nociceptivos térmicos mucho más altos que aquellos que son apenas capaces de producir sensaciones dolorosas en el hombre y reacciones provocadas por dolor en animales. Además los campos sensoriales son difíciles de localizar en este sistema espin-reticulo-talámico (41,42).

Todas estas características contrastan con aquellas de las neuronas relacionadas con el sistema espinotalámico directo en la médula espinal y el complejo ventrobasal. (77,88)

Estas, estas diferencias electrofisiológicas sugieren papeles distintos para estas dos vías en la transmisión del dolor. La vía espinotalámica directa y el complejo ventrobasal representarían los aspectos de discriminación sensorial de la transmisión del dolor (96). Por otro lado, los I.Tal. parecen estar particularmente relacionados con el dolor difuso y duradero así como con las características intrínsecas de la sensación dolorosa.

Albe-Fassard y col.(5) esquematizaron los mecanismos diencefálicos involucrados en el dolor, en donde los núcleos posteriores del tálamo son asociados con el reconocimiento del estímulo nociceptivo como tal, el núcleo ventral posterior con la localización del estímulo y los I.Tal. con los aspectos afectivos aversivos asociados a los estímulos dolorosos. De esta manera, los I.Tal. tienen una participación en la transmisión de los impulsos nociceptivos, y juegan un papel importante en el

procesamiento dolor.

En la fig.2 se muestra un esquema de las vías del dolor.

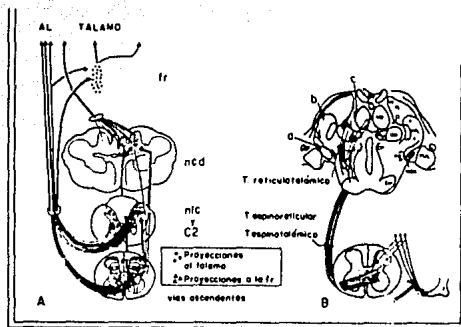


FIG.2 Vías ascendentes de la medula espinal / estructuras diencefálicas involucradas en la transmisión y procesamiento de la sensación dolorosa. En A, se observan el origen y trayectorias de los fascículos espinotalámicos / espinoreticular. En B, se observan las estructuras diencefálicas involucradas en la sensación dolorosa: a) discriminación de la sensación dolorosa; b) localización espacio-temporal; c) sensación desagradable y aversiva. Formación reticular, Fr; segmento cervical, C2; núcleo lateral cervical, nlc; núcleo de las columnas dorsales, nuc; medial dorsal, MD; ventral anterior, VA; ventral lateral, VL; central lateral, CL; centro mediano, CM; parafascicular, Pf; ventralposterolateral, VFL; pulvinar, PUL; complejo posterior, PO (Modificado de Albe-Fessard y col. 1935).

Con estos antecedentes el objetivo de este tesis es confirmar las conexiones recíprocas entre la CP y el CI y las conexiones de la CP y el CI con el Fato mediante la utilización de la técnica estadística con HRF-WG. En el siguiente capítulo se hace la descripción de la metodología empleada para realizar este trabajo.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

En este capítulo se describe la técnica histoquímica de trazadores de transporte retrógrado y anterógrado, con la lectina aglutinina de germen de trigo (WG) conjugada a peroxidasa de rabano (HRP), en virtud de que este compuesto (HRP-WG) es más eficiente porque su marcado permite localizar los cuerpos celulares y sus proyecciones axónicas al inyectarla en las regiones que son de interés.

Esta técnica siguió el procedimiento descrito por Mesulam (80), en la que emplea como cromógeno a la tetra-metil-benzidina (TMB) y al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato, lo que permite revelar el sitio de la inyección y el transporte retrógrado (cuerpos celulares) y anterógrado (fibras) de la lectina (ver apéndice 1).

Para estos experimentos se utilizaron 19 ratas macho albinas adultas de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 300 g. Los animales se dividieron en dos grupos, al primero se le inyectó la HRP-WG en el tálamo (Cl) y al segundo en la corteza (Cf). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital de sodio (40 mg/lp i.p.) y colocados en un aparato estereotáxico, se utilizaron las coordenadas anteroposteriores de las regiones corticales (A= 8.5-9.5; L=1.0-1.5; H=9.0) y las de los núcleos intralaminares talámicos (A=4.5-5.5; L=1.1-1.5; H=4.2-5.0), de acuerdo con las referencias anatómicas de Albe-Fessard y col (9).

Fig. 2 En el esquema se muestra el encéfalo de la rata, el sitio de inyección.

- Inyección en la CP
- △ Inyección en el Cl

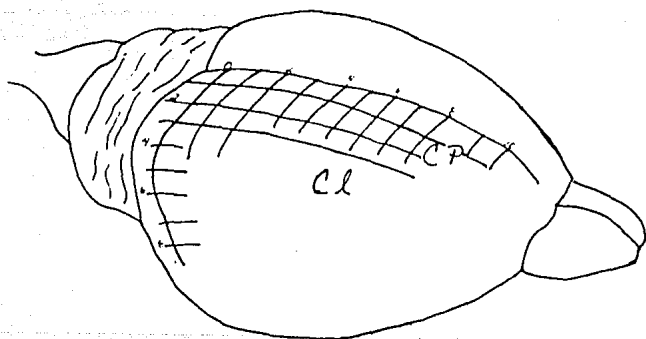
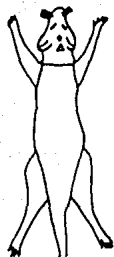


FIG.2 Muestra un esquema del cerebro de la rata con la localización estereotáctica de los sitios de inyección de la HRF-W3 en la CP y el núcleo Cl talámico.

A 11 ratas se les inyectó HRP-W6 en el núcleo C1 y a 8 en la corteza prefrontal. Las inyecciones se realizaron mediante el empleo de una jeringa Hamilton de 1 ml, la cual se adaptó a un micromanipulador y se le colocó una micropipeta de vidrio en la punta. La punta de la micropipeta tenía un diámetro de 20-30 μ m en su interior. La jeringa fue llenada de glicerina y minutos antes de la inyección se tomaban 20-40 ml de HRP-W6 diluida al 10% con solución salina, todo el procedimiento se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Los animales se dejaron sobrevivir 48 hrs. Se anestasiaron nuevamente y perfundieron por vía intracardiaca con solución Ringer 2% , solución fijadora de paraformaldehído al 5% , glutaraldehído al 2% seguida de una solución de lavado con sacarosa 10% .(ver apéndice 1)

Se extrajeron los cerebros y el tallo cerebral de los animales y se dejaron en postfijación de entre 7 a 7 hrs, posteriormente se pasaban a la solución de sacarosa al 10% dejando el tejido en esta 24 hrs.

Se hicieron cortes seriados por congelación de las regiones de interés de 40 μ m y se sometieron a la reacción enzimática con TMB. Los cortes se montaron y contratiñeron con safranina. Las laminillas con los cortes se observaron al microscopio de luz, para visualizar las células marcadas con la HRP-W6 y reconstruir las regiones en donde se localizaban.

Se hicieron cartografías de las regiones donde se encontró el marcaje anterógrado y retrogrado en las respectivas coordenadas anteroposteriores para el tálamo y la corteza lo cual permitió hacer el correlato anatómico de las proyecciones con el RD y atlas

de Watson y Palacios para el café.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En este capítulo se describen los resultados obtenidos con los métodos descritos previamente. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de mostrar la correlación anatómica del CI, corteza prefrontal, y núcleos del rafe que participan en los procesos nociceptivos.

La presentación se subdividió en dos secciones, en la primera se describen los hallazgos de las inyecciones de HRF-WG en el CI; en la segunda se muestran las áreas marcadas por las inyecciones de HRF-WG en la CF.

Las secciones del cerebro con el sitio de inyección fueron cortadas en orden (seriadas) para controlar el tamaño y la localización de la inyección.

Las inyecciones de HRF-WG mostraron dos tipos de marcado celular: El primero o transporte retrógrado permitió la localización de los cuerpos celulares que enviaban sus proyecciones axónicas al lugar de la inyección. Los somas se marcaron de manera homogénea con pequeños granulos negros (producto de la oxidación de la HRF-WG ver fig 4A).

Lo anterior hizo evidente las neuronas marcadas y descartaba la posibilidad de observar los precipitados formados por la reacción, los cuales eran de forma cilíndrica. Para resaltar más estas granulaciones los cortes se contratiñeron con safranina, este colorante tiñe únicamente los cuerpos neuronales. La figura 4 ilustra el transporte retrógrado y anterógrado de la HRF-WG.

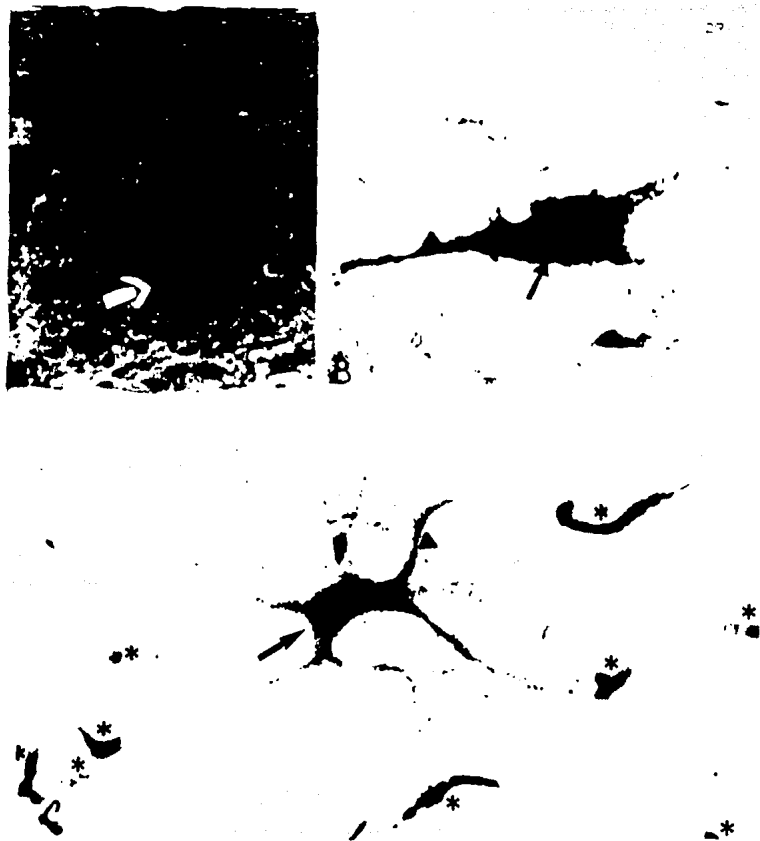


FIG. 4. Fotomicrografías que ilustran el transporte anterógrado y retrógrado de la HRP-WG en diferentes células en las cuales se observa claramente el soma (→) y sus prolongaciones dendríticas. En A) una neurona talámica, en B) se muestra célula del RD-SGC, C) es una neurona del núcleo CI del talamo. Notese los precipitados producto de la reacción (*).

El marcado producido por el transporte anterógrado, señalaba los sitios que atravesaron los somas se localizados en el sitio de la inyección. Este tipo de transporte marcó de manera heterogénea las prolongaciones neurales y se observó también como gránulos negros a lo largo de las fibras. En la fig. 4B se ven los dos tipos de transporte, (→) retrógrado y (▲) anterógrado.

1.- Inyecciones de HRP-WG en el Cl

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de las inyecciones de HRP-WG realizadas en el n.Cl del tálamo.

1.1. Se inyectó HRP-WG al 10% en un volumen de entre 30 y 40 nl en el Cl. Las inyecciones no se difundieron hacia otros núcleos talámicos cercanos, lo que permitió hacer evidentes las conexiones del Cl con la CP y con el tallo cerebral. Fig.5 se muestra un esquema de la región talámica en la que se realizaron las inyecciones de HRP-WG.



A

B

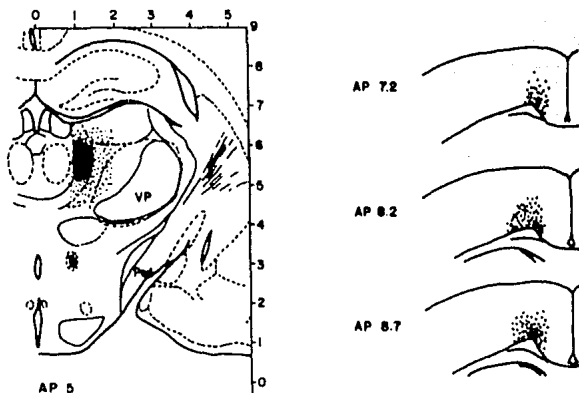


FIG.5 Fotomicrografía (A) y esquema (B) de la localización del sitio de inyección de la HRF-WG en el tálamo (coordenada A5) y del transporte retrógrado de la enzima hacia la corteza. En C, la localización de las neuronas corticales marcadas en diferentes planos. Se puede observar un mayor número de estas en las capas corticales profundas (IV, V y VI).

En esta figura también se muestra en diferentes planos anteroposteriores de la CP, la localización de las células corticales marcadas por el transporte retrógrado de la enzima.

1.2 Las neuronas de la corteza marcadas se localizaron entre las coordenadas anteroposteriores Ap 7.2, 8.2 y 8.7 de acuerdo al atlas de Albe-Fessard 1966. Cabe señalar que estos hallazgos se repitieron en todos los experimentos, esto es; siempre que se hicieron las inyecciones en el CI aparecían las células marcadas con HRF-WG en las mismas regiones. (ver fig.5)

1.3 La mayoría de las células marcadas se localizaron en las capas profundas de la corteza. (ver fig.5C)

1.4 Las inyecciones de HRF-WG en el CI mostraron el transporte retrógrado de la lectina hacia: a) la formación reticular, en especial en el núcleo gigantocelular, b) la sustancia negra, c) el núcleo reticular talámico el cual presenta gran cantidad de células marcadas, d) al núcleo lateral anterior, e) al núcleo subtalámico, f) al núcleo rojo y g) al hipotálamo.

1.5 En el tallo cerebral encontramos transporte retrógrado en núcleos de la SGC, RD, RMn, núcleos pontinos de la formación reticular, el área tegmental dorsal, el LC y comisuras profundas del cuerpo geniculado lateral.

1.6 Se encontró que las proyecciones del RD y el LC hacia el CI y a la CP son principalmente ipsilaterales. aunque también se encontraron células marcadas de el lado contralateral. La

La fig.6 muestra células marcadas por transporte anterógrado y retrógrado en el RD, núcleo LDTg, MnR y un grupo de células bien

localizadas en el LC.

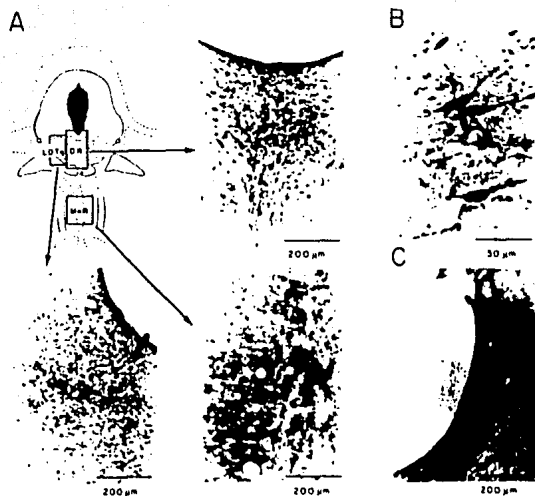


FIG.6 La fotomicrografía muestra marcaje con HRF-WB después de la inyección hecha en el CL. En A se observa en la parte superior izquierda un esquema del RD y RMn; en la parte superior derecha un grupo neuronal del RD (B). En la parte inferior izquierda se ven células del LDTg marcadas y en la parte inferior derecha un grupo de células bien localizado en el LC.

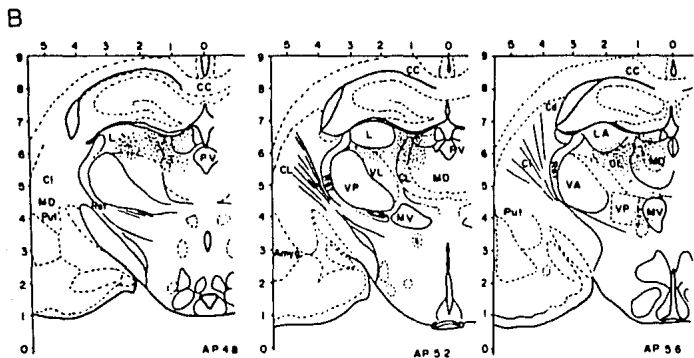


FIG. 7 En A) sitio de inyección hecho en la CP (ordenada AP 9). B) ilustra el transporte retrógrado al tálamo en distintos núcleos talámicos en los cuales se localizaron las neuronas marcadas en diferentes planos estereotáxicos.

inyecciones de HRP-WG en la CF

Se hicieron inyecciones de entre 20 y 40 μ l en la CF (AC-B, S-T, L) las cuales estaban bien localizadas. Una densidad alta de marcaje fue observada en varias áreas.

2.1 Se observó transporte retrogrado y anterógrado en la región cortical contralateral.

2.2 Se pudieron observar claramente las fibras de paso que atravesaron el neostriado, en la cabeza del Cd.

2.3 Una densidad moderada de aferentes poco marcada se observó en estructuras talámicas ventrales, como son: la parte ventral del cuerpo geniculado lateral, zona incerta, núcleo subtalámico, y en estructuras talámicas de la línea media como es el área posteromedial, núcleo de reuniens y núcleo paraentricular.

2.4 En el hipotálamo se observó transporte anterógrado de la HRP-WG en el núcleo ventro medial del hipotálamo, núcleo arqueado, núcleo anterior y núcleo paraentricular.

2.5 También se observó transporte en algunos de los núcleos de relevo talámico como son: el núcleo geniculado medial y laterodorsal y en el núcleo ventral.

2.6 En el núcleo centro mediano, parafoeicular, central lateral, reticular talámico y submedio, que están involucrados en los mecanismos del dolor, se observó que presentan transporte retrogrado y anterógrado de la enzima.

La porción lateral del núcleo mediodorsal se marcó consistentemente en comparación con la porción medial del mismo.

2.7 En el tallo cerebral encontramos transporte retrogrado

en el núcleo del rafe dorsal y sustancia gris central, rafe mediano, rafe pontino, y el núcleo de locus coeruleus.

Se observaron las células del CI marcadas entre las coordenadas anteroposteriores 4.8, 5.2 y 5.6 de acuerdo con las coordenadas anatómicas de Albe-Fessard (9). La fig. 7A es fotomicrografía y esquema del sitio, tamaño de inyección en la CF, B) muestra los diferentes planos de las células talámicas marcadas por el transporte retrogrado de la HRP-WG.

La fig. B es una fotomicrografía que muestra células marcadas retrogradamente en RD y LC como resultado de la inyección hecha en la CP.

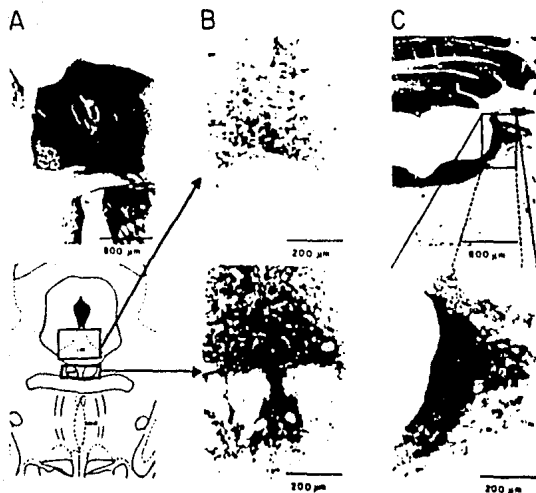


FIG. B La fotomicrografía muestra marcaje retrogrado en el RD y LC como resultado de la inyección hecha en la CP (A); en B, se muestran células del RD y en C neuronas del LC con marcaje retrogrado de HRP-WG.

A continuación se resalten las características celulares de los núcleos del RD, RMn y LC. Con respecto a su tamaño, en el RD y RMn se distinguen tres poblaciones de células: las pequeñas (peq), medianas (med) y grandes (gds), que eran bipolares o multipolares, como se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Tamaño (μ m) y forma de las células mesencefálicas marcadas por transporte retrogrado.

	Eipolares			Multipolares		
	peq	med	gds	peq	med	gds
RD	12.08	20.00	25.39	15.78	20.71	21.36
RMn	12.16	19.95	20.00	--	20.70	29.57
LC	--	--	--	--	20.32	29.90

CAPITULO V

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran la existencia de: 1) las conexiones recíprocas entre la CF y CI, 2) las conexiones con la CF contralateral, 3) las proyecciones del RD, MnF a la CF y CI, 4) las proyecciones del LC a la CF y CI.

1) Las inyecciones de HRP-WG en el CI y la CF muestran y confirman las conexiones recíprocas entre ambas estructuras (7,59). Estas fueron descritas con el empleo de diferentes técnicas anatómicas, electrofisiológicas (59,71). Se sabe que el CI procesa información nociceptiva, ya que este núcleo tiene aferencias de las vías espinotalámicas y trigeminotalámicas (5,79,19). Con respecto a la CF, se conoce que procesa información heterosensorial (70) incluyendo la nociceptiva (11,71).

La existencia de conexiones recíprocas entre la CF y el CI sugiere que pueden ser el sustrato morfológico de un mecanismo involucrado en la transmisión nociceptiva y en su control.

2) Las conexiones intracorticales bilaterales de la CF ya se habían descrito (113), este trabajo las confirma. Esta región cortical tiene conexiones con estructuras límbicas que forman parte del sistema que integra las emociones. Es probable que las conexiones intracorticales pudieran ser parte del sustrato anatómico que participa en la integración del componente emocional del dolor y del control de las respuestas motoras aversivas.

3) Las proyecciones del RD, MnF a CI y CF se conocen

ampliamente. El RD y MnR enían proyecciones ónicas al diencéfalo, y se ha sugerido que están relacionadas con diferentes aspectos de la transmisión somática, en particular con la transmisión nociceptiva (49,50,51,57,58).

En el laboratorio se identificaron con métodos electrofisiológicos las condiciones del RD y MnR, al observar la activación antidrónica y ortodrónica de estos núcleos por estimulación del CI o CF (30). Los resultados sugiere que son dos poblaciones neurales diferentes las que proyectan al CI y a la CF, ya que las velocidades de conducción son diferentes no obstante de tratarse de fibras Amielínicas (30).

En el sistema nervioso central la serotonina y las encefalinas se han asociado con la analgesia. Además se conoce que la mayor parte de la serotonina cerebral se localiza en los núcleos del rafe (10,35).

Anden y col. (19) al utilizar métodos sensibles y específicos de inmunohistoquímica / de determinación bioquímica de monoaminas encontraron un sistema neural serotoninérgico en los núcleos del rafe (RD y MnR), cuyos axones corren principalmente a lo largo del fascículo del cerebro medio anterior e inerva las estructuras corticales, límbicas e hipotálamicas.

Las proyecciones serotoninérgicas del tallo cerebral al diencéfalo son conocidas. La mayoría de las terminaciones han sido encontradas en los I.Tal. y complejo ventrobasal (24,122).

En otros trabajos se mostró la existencia de una vía serotoninérgica que se origina en el RD, que tiene efectos en la transmisión nociceptiva del núcleo Pf. Se ha sugerido que esta vía forma parte de un sistema ascendente de control del dolor.

puede producir analgesia, originarse de las eferencias de la FM y RD (4,110).

También se ha propuesto que la corteza desempeña un papel en la modulación del dolor (11,71). En estudios previos se mostró que la CF ejerce un control facilitador tónico sobre las células del tálamo medio, el bloqueo transitorio de dicho control y la estimulación eléctrica de la CF suprimen las respuestas al dolor en el tálamo medio (30).

La existencia de conexiones entre el RD, la CF y el CI sugieren que forman parte del sustrato morfológico de un mecanismo ascendente de control de la nocicepción, al parecer esta vía puede ser serotoninérgica (25,10).

4) En esta tesis se hacen evidentes las proyecciones del LC a la CF y al CI.

En otros trabajos también se describió que el LC tenía proyecciones al diencefalo y corteza cerebral. El LC procesa información heterosensorial y tiene un papel relevante en los mecanismos del sueño. La mayor parte de las neuronas de este núcleo son noradrenérgicas. En síntesis las vías serotoninérgicas y noradrenérgicas que tienen su origen en el RD y LC respectivamente, se propone que participan en la analgesia (10,34,35,26).

5) En el cerebro de los vertebrados se ha comprobado la existencia de numerosos neuropeptidos, entre los cuales se encuentran las encefalinas.

En varios estudios bioquímicos e inmunistoquímicos se describió que las encefalinas están ampliamente distribuidas en el cerebro de la rata (71,55,57).

Lo anterior sugiere que los péptidos opioides juegan un papel importante en varias funciones fisiológicas, entre ellas el dolor. Estas sustancias están particularmente localizadas en regiones involucradas en la transmisión y en el control de la información nociceptiva, tales como la médula espinal, el FD, la FR, la FGM, EGC, y el tálamo (22,27,55).

Lacturarian y col. (62) señalaron que algunos cuerpos celulares que contienen encefalinas se localizan en los núcleos FR y FV del tálamo. Asimismo, localizaron fibras encefalinérgicas en las regiones no-sales del tálamo, pero se desconoce el origen de sus cuerpos celulares.

6) La técnica empleada para la elaboración de este estudio se basa en el transporte axonal retrógrado y anterógrado de la lectina aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa de rabano (HRP-WG), ya que este compuesto es más eficiente como marcador que la HRP sola (80). El uso de esta lectina como trazador permite el marcado bidireccional (80) lo que nos permite identificar claramente las conexiones directas entre dos regiones. Sin embargo, esta técnica no nos permite identificar si las poblaciones neurales del rafe que proyectan al CI, de las que terminan en la CF son diferentes. Para ello es necesario hacer técnicas de doble marcado intracelular conjugando técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas. Los artefactos o productos de la reacción enzimática pueden ser identificados y descartados al emplear una buena técnica de contraindicación.

Otro estudio interesante de realizar es la identificación de los transmisores que están involucrados en esta vía y de esta forma confirmar la existencia, o no existencia de serotonina y

enfiteutas en las regiones ya mencionadas. (14)

13

B I B L I O G R A F I A

- 1 Aghajanian, G.K., Rosecrans, J.A. y Sheard, M.H., (1967). Serotonin: Release in the forebrain by stimulation of midbrain raphe. *Science*, 156 : 402-400.
- 2 Ajmoné-Marsan, C., (1965). The Thalamus. Data on its functional anatomy and on some aspects of thalamo-cortical integration. *Arch. Ital. Biol.* 102 : 547-562.
- 3 Alert, K., (1941). Comparative anatomy of the frontal cortex and thalamo-frontal connections. Eds: J.M. Warren, J. Alert (eds.), *The Frontal Granular Cortex and Behavior*, McGraw Hill, New York, 372-396 p.
- 4 Atil, H., Mayer, L.J., (1972). Antagonism of stimulation produced analgesia by-LPA, a serotonin synthesis inhibitor. *Brain Research*, 44 : 692.
- 5 Albe-Fessard, D., Berllet, E.J., Kruger, L., Ralstrom, H.J. y Willis, W.D., (1985). Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain Res. Reviews*, 9 : 217-296.
- 6 Albe-Fessard, D., Condes Lara, M. y Sanderson, P., (1983). The focal tonic cortical control of intralaminar thalamic neurons involve a cortico-thalamic loop. *Acta Morphologica Hungarica*, 31 : 9-26.
- 7 Albe-Fessard, D., Condes Lara, M., Sanderson, P. y Levante, A., (1984). Tentative explanation of the special role played by the areas of callosinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. Eds: L. Kruger, J.C. Liebeskind (eds.), *Advances in Pain Research and Therapy*, 11. Raven Press, New York, 167-182 p.
- 8 Albe-Fessard, D., Kruger, L., (1962). Duality of unit discharges from cat centrum medianum in response to natural and electrical stimulation. *J. Neurophysiol.* 25 : 3-23.

- 9 Albe-Fessard, D., Stutinsky, F. y Liboulan, (1966). Atlas Stereotaxique du Diencephale de Rat Blanc. Centre National de la Recherche, Paris, F.
- 10 Anden, N.E., Dalhstrom, A. y Fuxe, K., (1966). Ascending monoamine neurons to the Rhinencephalon and Diencephalon. Acta Physiol.Scand. 67 : 313-326.
- 11 Andersen, E., (1986). Pariaqueductal gray and cerebral cortex modulate responses of the medial thalamic neurons to noxious stimulation. Brain Research. 375 : 30-36.
- 12 Anderson, S.D., Basbaum, A.I. , Fields, H.L., (1977). Response of medullary, raphe neurons to peripheral stimulation and to systemic opiates. Brain Res. 123 : 363-365.
- 13 Auer, J., (1956). Terminal degeneration in the diencephalon after ablation of the frontal cortex in the cat. J.Anat. 90 : 30-41.
- 14 Bartfai, T., Iversfeldt, I. y Fiszew, G. (1968). Regulation of the release of co-existing neurotransmitters. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 28 : 285-310.
- 15 Beckstead, R.M., Domestic, V.B. y Nauta, W.J.H., (1970). Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. Brain Res. 175 : 191-216.
- 16 Besson, J.M., Guilbaud, G., Abdelmoumene, M. y Chaouch, A., (1982). Physiologie de la nociception. J.Physiol. 71 : 7-107.
- 17 Besson, J.M., Oliveras, J.L., Chaouch, A. y Rivot, J.P., (1981). Role of the raphe nuclei in stimulation producing analgesia. Ent. E. Haber, E. Gebel, M. P. Izidorides, y S.G.H. Allissato eds., Serotonin neurochemistry and function. 100. Advances in Exp.Biology and Med. New York, 150-176 p.
- 18 Bottilier, P., Dolange, E., Petitjean, P., Salvant, D., Tourat, M. y Joubat, A., (1975). The raphe nuclei of the cat brain stem: A topographical atlas of

- their efferent projection as revealed by autoradiography. *Brain Res.* 113 : 449-496.
- 19 Bolvie, J. (1970). The terminations of the cervicothalamic tract in the cat: an experimental study with silver impregnation methods. *Brain Research.* 19 : 333-363.
- 20 Bolvie, J. (1973). An anatomical reinvestigation of the terminations of the spinothalamic tract in the monkey. *J.Com.Neurol.* 155 : 343-370.
- 21 Bowsher, D. (1975). Role of the reticular formation in responses to noxious stimulation. *Pain.* 2 : 236-278.
- 22 Bowsher, D., Mallart, A., Petit, D. y Albe-Fessard, D. (1962). A bulbar relay to the centre median. *J.Neurophysiol.* 31 : 288-300.
- 23 Cajal, S., Ramon, Y. (1900). Contribución al estudio de la vía sensitiva central y de la estructura del tálamo óptico. *Rev.Trin.Microgr.* 5 : 185-199.
- 24 Casey, K.L. (1966). Unit analysis of nociceptive mechanisms in the thalamus of the awake squirrel monkey. *J.Neurophysiol.* 29 : 727-750.
- 25 Casey, K.L. (1980). Reticular formation and pain: toward a unifying concept. *Ent. J.J. Bonica (ed.) Pain.* Raven Press, New York, 90-105 p.
- 26 Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Kemper, T. y Morgane, P.J. (1982). Nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Research.* 247 : 17-28.
- 27 Cobb, S. (1961). Brain Size. *Arch.Neurol.* 12 : 555-561.
- 28 Londoño Lara, M., Gutiérrez Apudán, R. (1968). La neurofisiología del dolor. *Salud Mental.* 3 : 71-84.
- 29 Londoño Lara, M., León, Cea, M., Sánchez Alvaréz, M. y Omeña Zapata, I. (1968). Mesencephalic projections to the thalamic centralis lateralis and

- medial prefrontal corte : a WGA-HRF study. Brain Res, 1 : 1-4.
- 30 Condés Lara, M., Omaña Zapata, I., (1988). Suppression of noxious thermal evoked responses in thalamic central nucleus by cortical spreading depression. Pain, 35 : 199-204.
- 31 Condés Lara, M., Omaña Zapata, I., León Olea, M. y Sánchez Alvarez, M., (1989a). Dorsal raphe neuronal responses to thalamic centralis lateralis and medial prefrontal corte electrical stimulation. Brain Res, 499 : 141-144.
- 32 Condés Lara, M., Omaña Zapata, I., León Olea, M. y Sánchez Alvarez, M., (1989b). Torca. Raphe and medial prefrontal corte electrical stimulation. Brain Research, 499 : 141-144.
- 33 Jovenes, R., Fumo, H., Andra, C.H., Cesselin, F. y Conrath, M., (1986). Immunocytochemical study of enkephalin-like cell bodies in the thalamus of the cat. Brain Research, 377 : 355-361.
- 34 Cropper, E.C., Eisenman, J.S. y Azmitia, E.C., (1984). An immunocytochemical study of the serotonergic innervation of the thalamus of the rat. J.Comp. Neurol, 224 : 38-50.
- 35 Carlsson, A., Fuxe, K., (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in cell bodies of brain stem neurons. Acta.Physiol.Scand, 232 : 1-51.
- 36 La Vite, A.C., Smith, G.A., (1964). Subcortical projections of the prefrontal lobe in the monkey. J.Comp.Neurol, 123 : 413-424.
- 37 Landsey, E.W., Morrison, S.S., (1942). The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. Amer.J. Physiol, 135 : 297-300.

- 38 Dempsey, E.W., Morison, R.S., (1945). The electrical activity of a thalamo-cortical relay system. *Amer. J. Physiol.*, 138 : 283-296.
- 39 Dinopoulos, A., Paramanidis, A.N., Papadopoulos, G., Antocopoulos, J., Michaloudi, H., (1977). Thalamic projections to motor, prefrontal, and somatosensory cortex in the sheep studied by means of the HRP retrograde transport method. *J. Comp. Neurol.*, 241 : 63-81.
- 40 Long, A.L., Ryu, H., y Wagman, J.H., (1977). Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationships to spinothalamic pathway. *J. Neurophysiol.*, 41 : 1592-1610.
- 41 Fields, H.L., Clanton, C.H., y Anderson, S.D., (1977). Somatosensory properties of spinoreticular neurons in the cat. *Brain Res.* 120 : 49-66.
- 42 Fields, H.L., Wagner, G.M., y Anderson, S.D., (1975). Some properties of spinal neurons projecting to the medial brainstem reticular formation. *E.P. Neurol.* 47 : 118-134.
- 43 Frost, D.D., Caviness, V.S., (1960). Radial Organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J. Comp. Neurol.*, 194 : 369-393.
- 44 Ruster, J.M., (1980). *The prefrontal cortex*. Raven Press, New York, p.
- 45 Meyer, M.A., Puerto, A., Manles, D.E., Segal, D.S., y Mandell, H.J., (1976). Behavioral studies following lesions of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res.* 106 : 257-270.
- 46 Szasz, A.J., Yezierski, R.P., Gernhart, J.D., y Willis, A.D., (1981). Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.* 46 : 1285-1306.

- 47 Goldman, F.S., Neuka, W.J.H., (1977). Columnar distribution of cortico-cortical fiber in the frontal-association, limbic and motor cortex in the developing rhesus monkey. *Brain Res.* 122 : 393-413.
- 48 Grossman, A., Lieberman, A.R. y Webster, K.E., (1973). A Golgi study of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *J.Comp.Neur.* 159 : 441-466.
- 49 Guilbaud, G., Cailla, D., Besson, J.M. y Benelli, G., (1977). Single unit activities in ventral posterior and posterior group thalamic nuclei during nociceptive and non-nociceptive stimulations in the cat. *Arch.Ital.Biol.* 17 : 13-56.
- 50 Guilbaud, G., Peschanski, M., Gautron, M. y Binder, D., (1980a). Responses of neurons of the nucleus raphe magnus to noxious stimuli. *Neurosci.Lett.* 12 : 149-154.
- 51 Guilbaud, G., Peschanski, M., Gautron, M. y Binder, D., (1980b). Neurons responding to noxious stimulation in VB complex and caudal adjacent regions in the thalamus of the rat. *Pain.* 5 : 303-318.
- 52 Guillery, R.W., (1971). Patterns of synaptic interconnections in the dorsal lateral geniculate nucleus of cat and monkey: A brief review. *Union-Pas Suppl.* 3 : 211-227.
- 53 Hendry, S.H.D., Jones, E.A., Graham, J., (1979). Thalamic relay nuclei, for the cerebellar and certain related fiber system in the cat. *J.Comp.Neural.* 185 : 579-614.
- 54 Merzenich, M., (1981). Laminar organization of the thalamic projections to the neocortex. *Science* 217 : 522-535.
- 55 Hill, R.J., Kasper, G.M. y Mitchell, J.P., (1976). Depression of nociceptive and other neurons in the brain by L-typhostadil, applied Met-enkephalin.

- Nature (London), 162 : 604-606.
- 56 Houser, C.R., Vaughn, J.E., Barber, F.P. y Roberts, E., (1980). GABA neurons are the mayor cell type of the nucleus reticularis thalami. Brain Res. 200 : 341-354.
- 57 James, C.W., Jerome, L.M. y Petrusz, P., (1981). The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. J. Comp. Neurol., 198 : 541-565.
- 58 Jasper, H.H., (1949). Diffuse projection system: The integrative action of the thalamic reticular system. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 1 : 405-420.
- 59 Jones, E.G., (1986). Thalamus. Plenum Press, New York, p.
- 60 Jones, E.G., Leavitt, R.V., (1974). Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. J. Comp. Neurol., 154 : 349-373.
- 61 Jones, E.G., Powell, T.P.S., (1970). An anatomical study of converging sensory pathways within the cerebral cortex of monkey. Brain Res., 93 : 793-820.
- 62 Pachatzurken, H., Lewis, M.E. y Watson, C.J., (1983). Systems in the encephalon and brainstem of the rat. J. Comp. Neurol., 220 : 317-320.
- 63 Saveliers, M., (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. Brain Research., 41 : 827-831.
- 64 Levitt, J., Kupfers, H.G. J.M., (1977). Organization of the thalamic cortical connections to the frontal lobe in the rhesus monkey. Brain Res., 99 : 295-322.

- 65 Kolb, E., (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Res.* 3 : 65-98.
- 66 Krettek, J.E., Price, J.L., (1977). The cortical projections of the medial dorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J.Comp.Neural.* 171 : 587-722.
- 67 Kruger, L., Ribe-Fessard, (1960). Distribution of responses to somatic afferent stimulus in the diencephalon of the rat under chloralose anesthesia. *Exp Neurol.* 2 : 442-457.
- 68 Land, R.C., Webster, J.L., (1975). Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei: An experimental anatomical study in the rat. *J.Comp. Neurol.* 130 : 313-316.
- 69 Leonard, C.M., (1969). The frontal cortex of the rat: I. Cortical projections of medial dorsal nucleus. II Efferent connections. *Brain Res.* 12 : 321-343.
- 70 Levine, P.M., (1936). The efferent fibers of the frontal cortex of the monkey, *Macaca mulatta*. *J.Comp.Neural.* 63 : 369-419.
- 71 Lidov, H.G.W., Grzanna, R., McIliver, M.E., (1980). The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat-an immunohistochemical analysis. *Neuroscience.* 5 : 207-227.
- 72 Liebeskind, J.C., Glasier, G.J., y Urca, W., (1976). Evidence pertaining to an endogenous mechanism of pain inhibition in the central nervous system. *Enf* D. Cottarman (ed.), *Sensory Functions of the Brain in Primates*, Pergamon Press, Oxford, 561-573 p.
- 73 Lilly, J.A., Cristiana, C., Leonard, M., Donald, W.P., (1968). Connections of the Median and Dorsal Raphe nuclei in the rat: An autoradiographic and degeneration study. *J.Comp.Neural.* 156 : 179-276.

- 74 Llinás, R., Avendano, C. y Reinoso-Euarez, F., (1977). Amygdaloid projections to prefrontal and motor cortex. *Science*, 195 : 794-796.
- 75 Lorente de NO, R., (1936). Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. En: J. Fulton (ed.), *Physiology of the Nervous System*, 275 : 291-340 p.
- 76 Macchi, G., Bentivoglio, M., D'Atena, C., Rossini, F. y Tempesta, E., (1977). The cortical projection of the thalamic intralaminar nuclei, restudied by means of the HRP retrograde axonal transport, *Neurosci. Lett.* 4 : 121-127.
- 77 Meyer, R., y Price, D.L., (1975). Central nervous system mechanisms of Analgesia. *Pain*, 2 : 374-404.
- 78 Menier, W.R., (1959). Some neurological species differences a posteriori. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 167 : 424-468.
- 79 Menetrey, D., Chaouch, A. y Besson, J.M., (1979). Responses of spinal cord dorsal horn neurons to non-noxious and noxious peripheral temperature changes in the spinal rat. *Pain*, 5 : 165-182.
- 80 Mesulam, M.M., (1981). *Tracing Neuronal Connections with Horseradish Peroxidase*. John Wiley & Sons, New York, 251 p.
- 81 Molinari, M., Mancinocchi, D., Bentivoglio, M. y Macchi, G., (1985). Efferent fibers from the motor cortex terminate bilaterally in the thalamus of rats and cats. *Exp. Brain Res.* 57 : 305-312.
- 82 Moolenaar, S.M., Holloway, J.A. y Frothing, D.O., (1976). Responses of dorsal raphe neurons to peripheral nociceptive stimulation. *Exp. Neurol.* 53 : 304-313.
- 83 Norrish, A.S., Tempesta, E.W., (1942). A study of thalamo-cortical relations. *Brain*, 65 : 125 : 131-139.

- 84 Morison, R.S., Dempsey, E.W. (1942b). Mechanisms of thalamo-cortical augmentation and repetition. *Amer. J. Physiol.* 138 : 297-303.
- 85 Nashold, B.S., Hanbery, J. y Oliszewski, J. (1955). Observations on the diffuse thalamic projections. *Electroencephalogr. clin. Physiol.* 7 : 603-611.
- 86 Nauta, W.J.H. (1964). Some efferent connections to the prefrontal cortex in the monkey. *Enf. J.M. Warren, J. Akert (eds.)*. The frontal granular cortex and Behavior, McGraw Hill, New York, 397-407 p.
- 87 Nauta, W.J.H. (1972). Neural associations of the frontal cortex. *Acta Neurobiol. Exp.* 32 : 125-140.
- 88 Nauta, W.J.H., Kuypers, H.G.J.M. (1958). Some ascending pathways in the brain stem reticular formation. *Enf. H.H. Jasper (ed.)*. Reticular Formation of the Brain, Little Brown, Boston, 7-30 p.
- 89 Nauta, W.J.H., Withlock, D.G. (1954). An anatomical analysis of the nonspecific thalamic projection system. *Enf. J.F. Delafraigne (ed.)*. Brain Mechanisms and Consciousness, Blackwell, Oxford, 81-116 p.
- 90 Newman, J.D., Lindsley, D.F. (1976). Single unit analysis of auditory processing in squirrel monkey frontal cortex. *Exp. Brain Res.* 25 : 169-181.
- 91 Oliveras, J.L., Sierralta, F., Fardin, V. y Besson, J.M. (1981). Implication des systemes serotonergiques dans l'analgesie induite par stimulation electrique de certaines structures du tronc cerebral. *J. Physiol.* 77 : 473-482.
- 92 Pandya, D.N., Kuypers, H.G.J.M. (1969). Cortico-cortical connections in the rhesus monkey. *Brain Res.* 14 : 49-61.
- 93 Paschanski, M., Besson, J.M. (1974a). Diacephalic connections of the thalamic nuclei of the rat brainstem: An anatomical study with reference to the

- somatosensory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 114 : 509-514.
- 94 Paschanski, M., Sessom, J.M., (1984b). A spinothalamic-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. *Neuroscience*, 12 : 165-179.
- 95 Paschanski, M., Guilbaud, G., & Gautron, M., (1981). Posterior intralaminar region in the rat: neuronal responses to noxious and non-noxious cutaneous stimuli. *Eur. J. Neurosci.*, 72 : 226-238.
- 96 Paschanski, M., Guilbaud, G., Lee, C.L., & Manthly, P.W., (1980). Involvement of the rat ventrobasal thalamic complex in the sensory-discriminative aspects of pain: electrophysiological and anatomical data. *Enf. G. Macchi, A. Rustioni, & R. Spreafico (eds.), Somatosensory integration in the thalamus. Elsevier, Amsterdam, 149-162 p.*
- 97 Pflieger, H.H., Chow, K.L., & Semmes, J., (1953). Limit and organization of the cortical projections from the medial thalamic nucleus in the monkey. *J. Comp. Neurol.*, 14 : 443-458.
- 98 Ruggie, J.F., Mountcastle, V.B., (1960). A study of the functional contribution of the laminal and spinothalamic systems to somatic sensibility. *Central nervous mechanisms in pain. Bull. Johns Hopk Hosp*, 106 : 106-116.
- 99 Rowell, T.F., & Jovan, W.M., (1954). The connections of the midline and intralaminar nuclei of the thalamus of the rat. *J. Anat.*, 89 : 307-319.
- 100 Rudolph, H., & Anderson, E.J., (1975). Morphine analgesia: blockade by raphe nucleus lesions. *Brain Res.*, 96 : 111-118.
- 101 Saito, T., & Sato, N., (1959). Dorsal raphe stimulation modulates nociceptive responses in thalamic parvocellular neurons via an ascending

- pathways: further studies on ascending pain modulation pathways. *Pain*, 34 : 55-74.
- 102 Ramon-Moliner, E. (1962). An attempt at classifying nerve cell on the basis of the dendritic patterns. *J Comp Neurol*, 119 : 211-227.
- 103 Rinvik, E. (1972). Organization of thalamic connections from motor and somatosensory cortical areas in the cat. En: T.L. Frisvold, E. Rinvik, y M. D. Yahr (eds.), Corticothalamic projections and sensorimotor activities. Raven Press, New York. 57-90 p.
- 104 Rose, J.E., Woolsey, C.N. (1949). The orbito frontal cortex and its connections with the medio dorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res.Pub. Assoc.Nerv.Ment.Dis.*, 27 : 210-232.
- 105 Rose, J.E., Woolsey, C.N. (1949). Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *Electroencephalgr.clin.Neurophysiol.*, 1 : 391-409.
- 106 Samanin, R., Gumulka, W. y Valzelli, L. (1970). Reduced effect of morphine in midbrain raphe lesioned rats. *Eur.J.Pharmacol*, 10 : 339-343.
- 107 Sanders, K.H., Klein, C.E., Mayer, T.E., Heym, C.H. y Handwerker, O.H. (1980). Differential effects of noxious and non noxious input on neurones according to location in ventral periaqueductal grey or dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 196 : 32-37.
- 108 Sar, M., Stumpf, W.E., Miller, R.J., Chang, K.J., Cuatrecasas, P. (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J.Comp.Neurology* 183 : 17-38.
- 109 Sarter, M., Makowitsch, H.J. (1984). Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic and brainstem neurons,

- J. Comp. Neurol. 224 : 445-460.
- 110 Sawynok, J., Reid, A. (1989). Lesion to ascending noradrenergic and serotonergic pathways modify antinociception produced by intracerebroventricular administration of morphine. Neuropharmacology. 28 : 141-147.
- 111 Scheibel, M.E., Scheibel, A.B. (1961). Patterns of organization in specific and nonspecific thalamic fields. Eni D.F. Purpura, M.D. Yahr (eds.), The thalamus. Columbia University Press, New York. 13-46 p.
- 112 Scheibel, M.E., Scheibel, A.B. (1967). Structural organization of nonspecific thalamic nuclei and their projection toward cortex. Brain Res. 5 : 60-94.
- 113 Scheibel, M.G., Scheibel, A.B. y Davis, G.H. (1972). Some substrates for centrifugal control over thalamic cell ensembles. Eni T.L. Frigyesi, E. Rinvik, y M.D. Yahr (eds.), Corticothalamic projections and sensorimotor activities. Raven Press, New York. 131-155 p.
- 114 Shephered, G. (1974). The Synaptic Organization of the Brain. Oxford Univ. Press, Londres. 364 p.
- 115 Stariz, F.E., Whitlock, D.G. (1952). Diffuse thalamic projection system in monkey. J. Neurophysiol. 15 : 442-463.
- 116 Steriade, M. (1981). Mechanisms underlying cortical activation: Neuronal organization and properties of the midbrain reticular core and intralaminar thalamic nuclei. Eni G. Pomperand, C. Ajmoné Marsan (eds.), Brain Mechanisms of Perceptual Awareness. 227-277 p.
- 117 Steriade, M., Deschênes, M. (1964). The thalamus as neuronal oscillator. Brain Res. 8 : 1-60.

111. Steriade, M., & Gienn, L. (1982). Nucleocortical and caudate projections of intralaminar thalamic neurons and their synaptic excitation from midbrain reticular core. *J. Neurophysiol.* 48 : 352-371.
112. Tombal, F. (1967). Short neurons and their synaptic relations in the specific thalamic nuclei. *Brain Res.* 3 : 307-326.
113. Torebjök, H.E., & Hallin, R.H. (1973). Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fiber responses in intact skin nerves. *Exp. Brain Res.* 16 : 321-322.
114. Treisman, D.L., & Gerrens, E. (1977). Confirmation and localization of spinothalamic neurons in the cat and monkey, by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 96 : 171-177.
115. Willcockson, S.W., Jim, J., Shin, H.J., Chung, J.M., & Willis, W.D. (1986). Actions of opioids on primate spinothalamic tract neurons. *Journal of Neuroscience.* 6 : 2509-2520.
116. Willis, W.D. (1982). Control of nociceptive transmission in the spinal cord. *Int. P. Austriac. E.R. Ottosch. F. Schmidt, y R.F. Schmidt (eds.), Progress in Sensor. Physiology.* 2. Springer-Verlag, New York, 153 p.
117. Zeman, F.F., Leonard, G.N., & Low, L. (1978). Ascending tracts of the lateral columns of the rat spinal cord: a study using the silver impregnation and HRP techniques. *Exp. Neurol.* 62 : 299-334.
118. Zilles, J. (1985). *Rat cortex.* Verlag Berlin, Berlin, G.

A N E X O I C E I

TECNICA DESCRITA POR MESULAM

Procedimiento Histoquímico Para Marcar Vias Con Ferri Idasa
De Rabano Conjugada con Germen De Trigo (IRF-WG)

Este método se subdivide en 2 partes: 1) Preparación de soluciones
y 2) Técnica histoquímica.

1. Preparación de las soluciones1.1 Solucion madre (conservar en frío a 4°C)

NaCl: 90 gr.

KCl: 4.2 gr.

CaCl: 2.4 gr.

Agua destilada aforar hasta completar 1000 ml.

1.2 Ringer 9%

Solucion madre: 100 ml.

Agua bidestilada: 900 ml.

Bicarbonato de sodio: 0.15 gr.

1.3 Amortiguador

1.3.1 Fosfatos

A: sol. de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.6 g NaH_2PO_4 en 1000 ml de agua bidestilada).

B: sol. de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (50.65 g Na_2HPO_4 o bien, 71.7g. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml agua destilada).

-Para la HFF: -amortiguador fosfatos 0.1M

1.3.2 Acetato

-Acetato de sodio: 1.04 gr.

-Agua bidestilada: 40 ml (para disolver el acetato de sodio).

-HCL 1 N: 19 ml (15 ml en 90 ml de agua bidestilada, aforar hasta obtener un pH=3.3)

-Agua bidestilada: completar 100 ml.

En una probeta de 100 ml se disuelve el acetato de sodio en 40 ml de agua bidestilada. Se agrega el HCl hasta lograr un pH de 3.3 y agua bidestilada hasta completar 100 ml.

1.3.3 Solucion madre de

Paraformaldehido 5%

- 25 g de paraformaldehido

- completar hasta 500 ml con amortiguador fosfato 0.1 M.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- disolver en un agitador térmico a 50°C
- enfriar rápidamente con agua corriente hasta 22°C
- filtrar y conservar a 4°C.

2. PROCEDIMIENTO HISTOQUÍMICO

2.1 Preparación de la peroxidasa de rabano (HRP)

Se disuelve 1 mg del producto en 10 ml de suero fisiológico.

- se recomienda fraccionar la solución 5 veces (2 ml)
- se guarda en el congelador
- NO SACAR el producto del congelador sino es para usarse.

2.1.2 Preparación de laminillas gelatinadas cromadas.

- gelatina Q.P: 1.25 gr.
- alumina de cromo: 0.125 gr.
- agua bidestilada: 250 ml.

Se disuelve la gelatina en el agua bidestilada a 60°C, agregar el aluminio y filtrar.

LOS FORTAOBJETOS:

- se lavan con ácido nítrico de 5 a 10 min.
- se lavan con agua corriente.
- se les dan dos baños con alcohol al 75%
- se ponen en un portalamias
- se sumergen en un recipiente con agua destilada
- se escurren bien
- se sumergen en la solución de gelatina durante 7 min.
- se escurren y se ponen a secar durante la noche a 4°C.
- se guardan a 4°C.

2.2 Perfusión

Líquido de perfusión

- amortiguador fosfato 0.1 M	470
- solución madre de paraformaldehído al 5%	60
- el momento de la perfusión: 2% glutaraldehído 25%	50
	<hr/>
	600 ml

2.2 Lavado

- amortiguador fosfatos 0.1 M pH 7.4	950 ml
- sacarosa	100 gr.

Se disuelve la sacarosa y se perfunde con la solución a 4°

C. E. tejido debe conservarse en esta solución al menos una noche y puede mantenerse durante 2 a 7 días.

2.4 Histología

Cortes

Los cortes se hacen con la técnica de congelación y seriados de 40 μ m. Se recogen en la solución de amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 y se pueden conservar en esta solución durante 7 días.

2.5 Revelado Histoquímico de la enzima

2.5.1 Incubación

- lavar los cortes con agua bidestilada 3 veces por minuto.
- incubar los cortes durante 20 minutos a 19- 23 C en una mesa con movimiento y en la oscuridad (tapan).

Los cortes se incuban en 100 ml de una solución que se prepara al mezclar las soluciones A y B.

Solución A (estable 2 horas)

100 ml 150 ml

- agua bidestilada	72.5	172.5
- amortiguador acetato 0.2 M pH 5.7	5	7.5
- nitró ferricitronica de sodio	100 mg	150 mg

Solución B (estable 2 horas)

- etanol	25 ml	3.75 ml
- tetrametilbenzidina (TMB)	5 mg	7.5 mg

Calentar con agua corriente (40°C) para disolver la TMB. La solución A se añade a la B, se mezclan y se agrega la solución al recipiente con los cortes. La TMB se oxida fácilmente y por lo tanto es recomendable NO tener agentes oxidantes. El medio debe conservar un color amarillento hasta el final de la incubación sino se debe sospechar de una contaminación química.

2.5.2 Reacción enzimática.

La reacción enzimática dura 20 min a 10-20°C. Esta se inicia al agregar 2-4 ml de H₂O₂ puede variar de una a otra vez hasta obtener la sensibilidad máxima.

- poner 1 ml de H₂O₂ 50% y completar a 100 ml con agua bidestilada.

2.5.3 Lavado

Después de la reacción enzimática los cortes se transfieren a una solución de amortiguador de acetatos (0.01 N), y se hacen tres baños de 1 minuto en esta solución.

- 450 ml de agua destilada
- 25 ml de amortiguador acetato pH 3.5

Es importante que esta solución este fría (4°C) para bloquear la reacción, los cortes se pueden quedar en el último baño un máximo de 4 hrs hasta el momento de montar.

2.6 Montaje

Los cortes se suspenden en el amortiguador de acetatos y se montan en los portaobjetos gelatinados.

2.7 Contratinción

Los cortes se contratan con safranina al 0.01% en agua destilada durante 3-4 min.

La reacción de la TMB se degrada rápidamente en presencia de alcohol, por lo que hay que deshidratar rápidamente (10-20 seg) en cada alcohol (70, 95, 100, 100 y 100%).

Los cortes pueden permanecer hasta 5 min en 100%.