

161

21

Pedro Nuñez Abades

ORGANIZACION NEURONAL DEL GRUPO RESPIRATORIO
VENTRAL EN LA RATA

PEDRO NUÑEZ ABADES

JULIO, 1992

TD-289

B.11695





UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD
FIZIOLOGIA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral ORGANIZACION ~~VENTRAL~~ NEURON DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL DE LA RATA

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 28 de mayo de 1995

PEDRO NÚÑEZ ATADES

ORGANIZACION NEURONAL DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL EN LA RATA

Trabajo presentado por el Licenciado D. Pedro Núñez Abades para optar al grado de Doctor por el Programa de Doctorado en Neurociencia.

Director del trabajo



Fdo. Dña. Mª del Rosario Pásaro Dionisio profesora titular de Fisiología, del Dpto. de Fisiología y Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.



Fdo. PEDRO NÚÑEZ ABADES



AVDA. REINA MERCEDES, 6
TELEFONOS: 95 461 21 01 - 462 50 07
FAX: 95 - 423 34 80

DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGIA Y BIOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
SEVILLA- 41012

D. JOSE M^a DELGADO GARCIA, Catedrático de Fisiología y Director del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: que el trabajo titulado "ORGANIZACION NEURONAL DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL EN LA RATA", ha sido realizado en este Departamento, por D. Pedro Núñez Abades, bajo la dirección de la Dra. Rosario Pásaro Dionisio.

Y para que así conste, se firma la presente en Sevilla a veintisiete de mayo de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José María Delgado García".

Fdo. D. José María Delgado García.

DEDICATORIA

A Ana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento al Profesor Dr. D. José María Delgado García, Director del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla, por haberme introducido en el campo de la Neurociencia como alumno de la asignatura "Técnicas de Neurofisiología" y acogerme en su Departamento permitiendo la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi más sincero agradecimiento a la Profesora Dra. Dña. Rosario Pásaro, quien con su constante dedicación me ha apoyado y estimulado, haciendo posible que este trabajo salga a la luz, animándome a realizar estancias en el extranjero que han resultado ser muy positivas para mi formación investigadora.

Agradezco al Dr. D. Federico Portillo su ayuda y apoyo, sobre todo en los inicios de esta Tesis Doctoral y en mis primeras estancias en Laboratorios extranjeros.

A los profesores Dres. D. Blas Torres, D. Miguel Escudero y D. Fernando Calero que, junto a las personas antes mencionadas, han creado un Laboratorio de reconocida calidad científica en el que se pueden llevar a cabo una gran labor investigadora.

A mis compañeros de trabajo, Dra. Dña. Blanca Cabrera, Dña. Rosa Rodríguez de la Cruz y D. Angel Pastor les agradezco su profunda amistad y colaboración.

A los doctorandos Dña. Ana María Morillo, Dña. Susana Gaytán y D. Clemente Zamora les agradezco su colaboración en la última

fase de esta Tesis Doctoral, esperando que pronto sigan mis pasos y terminen a su vez sus Tesis Doctorales respectivas.

A Dña. Carlota Gómez, D. José Antonio Adame, D. Joaquín Deaño, D. Alfonso Franco y Dña. Rosario Jiménez les agradezco su eficaz labor de apoyo técnico y secretaría.

A los profesores Dres. M. Armand L. Bianchi, M. Jean C. Barillot y M. Laurent Grelot del Departamento de Fisiología y Neurofisiología de la Universidad de Marsella (Francia); y a los profesores Dres. Mr. Willian E. Cameron, Mr. Germán Barrionuevo y Mr. John Spielmann del Departamento de Neurociencia del Comportamiento de la Universidad de Pittsburgh (USA), les agradezco sus atenciones y enseñanzas durante las estancias realizadas en sus Laboratorios respectivos.

Por último, quiero agradecer el apoyo económico de la CYCIT, Junta de Andalucía y Comisión Asesora Hispano-Francesa por los proyectos de investigación subvencionados. También quiero agradecer al M.E.C. la Beca de Investigación que he disfrutado durante estos últimos años y las Becas para la realización de estancias cortas en el extranjero.

1.- INTRODUCCION	5
1.1- EL SISTEMA RESPIRATORIO: VISION GENERAL	6
1.1.1.- Caja torácica y pared abdominal	6
1.1.1.1.- <i>Diafragma</i>	8
1.1.1.2.- <i>Músculos intercostales</i>	10
1.1.1.3.- <i>Músculos abdominales</i>	11
1.1.2.- Vías aéreas superiores	12
1.1.2.1.- <i>Musculatura nasolabial</i>	15
1.1.2.2.- <i>Musculatura lingual</i>	15
1.1.2.3.- <i>Musculatura faríngea</i>	17
1.1.2.4.- <i>Musculatura laríngea</i>	17
1.2.- AREAS NEURONALES GENERADORAS DEL PATRON RESPIRATORIO	19
1.2.1.- Neuronas respiratorias	20
1.2.2.- Localización de las neuronas respiratorias	23
1.2.2.1.- <i>Centro neumotáxico</i>	25
1.2.2.2.- <i>Centro apneúsico</i>	27
1.2.2.3.- <i>Grupo Respiratorio Dorsal</i>	27
1.2.2.4.- <i>Grupo Respiratorio Ventral</i>	29
1.2.2.4.1.- <u>Grupo Respiratorio Ventral caudal</u>	29
1.2.2.4.2.- <u>Grupo Respiratorio Ventral rostral</u>	30
1.2.2.4.3.- <u>Complejo de Bötzing</u>	30
1.2.3.- Conexiones entre los grupos respiratorios bulbares	31
1.2.4.- Aferencias a las áreas respiratorias centrales	36
1.2.4.1.- <i>Aferencias pulmonares: receptores de adaptación lenta</i>	36
1.2.4.2.- <i>Aferencias pulmonares: receptores de adaptación rápida</i>	37
1.2.4.3.- <i>Aferencias cardiovasculares</i>	37
1.2.4.4.- <i>Aferencias laríngeas</i>	38
1.2.4.5.- <i>Aferencias frénicas</i>	38
1.2.4.6.- <i>Aferencias intercostales</i>	39
1.2.4.7.- <i>Aferencias abdominales</i>	39

1.2.4.8.- Aferencias desde otras estructuras centrales.....	39
1.2.5.- Características de los centros respiratorios en la rata	40
2.- PLANTEAMIENTO GENERAL Y OBJETIVOS	43
3.- MATERIAL Y METODOS	46
3.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION	48
3.2.- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO	48
3.2.1.- Caracterización de las neuronas craneales del núcleo Ambiguo.....	49
3.2.2.- Caracterización de la organización topográfica del Grupo Respiratorio Ventral.....	51
3.2.3.- Caracterización de las proyecciones aferentes a las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral	54
3.2.4.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales a las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral	55
3.2.5.- Caracterización de las proyecciones eferentes del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical.....	58
3.2.6.- Caracterización de las proyecciones eferentes bilaterales del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical	61
3.3.- TRATAMIENTO POSTOPERATORIO	63
3.4.- PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS	63
3.4.1.- Perfusión y fijación	63
3.4.2.- Técnicas histológicas	64
3.5.- ESTUDIO Y ANALISIS DEL MATERIAL	65
4.- RESULTADOS.....	69
4.1.- CARACTERIZACION DE LAS NEURONAS CRANEALES DEL NUCLEO AMBIGUO.....	70
4.1.1.- Localización de las motoneuronas	70
4.1.2.- Localización relativa de unas motoneuronas respecto de otras.....	73
4.2.- CARACTERIZACION DE LA ORGANIZACION TOPOGRAFICA DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	78
4.2.1.- Neuronas propiobulbares.....	78
4.2.2.- Neuronas bulboespinales.....	84
4.2.3.- Motoneuronas	85
4.2.4.- Organización en el Grupo Respiratorio Ventral de las neuronas propiobulbares, bulboespinales y motoneuronas...	85
4.3.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES A LAS TRES	

SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	90
4.3.1.- Localización de las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral	90
4.3.2.- Sitios de inyección	91
4.3.3.- Conexiones aferentes al Grupo Respiratorio Ventral	91
4.3.3.1.- Interconexiones entre las subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral	92
4.3.3.2.- Núcleo del tracto Solitario	92
4.3.3.3.- Núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse	98
4.3.3.4.- Núcleo paragigantocelular lateral	102
4.3.3.5.- Campo tegmental lateral	102
4.3.3.6.- Núcleo retrotrapezoide	104
4.3.3.7.- Campo tegmental magno celular	104
4.3.3.8.- Núcleos del rafe	104
4.3.3.9.- Núcleo trigémino espinal	106
4.3.3.10.- Otros núcleos	106
4.4.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES BILATERALES A LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	107
4.4.1.- Sitios de inyección	107
4.4.2.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Complejo de Bötzing	109
4.4.3.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral rostral	109
4.4.4.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral caudal	113
4.5.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL	113
4.6.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES BILATERALES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL	116
5.- DISCUSION	120
5.1.- CARACTERIZACION DE LAS NEURONAS CRANEALES DEL NUCLEO AMBIGUO	122
5.1.1.- Consideraciones funcionales	124
5.2.- CARACTERIZACION DE LA ORGANIZACION TOPOGRAFICA DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	124
5.2.1.- Neuronas propiobulbares	125
5.2.2.- Neuronas bulboespinales	126
5.2.3.- Organización en el Grupo Respiratorio Ventral de las neuronas propiobulbares, neuronas bulboespinales y motoneuronas	127
5.2.4.- Consideraciones funcionales	128

5.3.-	CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES A LAS TRES	
	SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	129
5.3.1.-	Interpretación de los sitios de inyección	129
5.3.2.-	Interconexiones entre las neuronas del Grupo Respiratorio Ventral	130
5.3.3.-	Núcleo del tracto Solitario	131
5.3.4.-	Núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse	133
5.3.5.-	Núcleo paragigantocelular lateral	133
5.3.6.-	Núcleo retrotrapezoide	134
5.3.7.-	Campo tegmental lateral	135
5.3.8.-	Campo tegmental magnocelular	135
5.3.9.-	Núcleos del rafe	135
5.3.10.-	Núcleo trigémino espinal	136
5.3.11.-	Consideraciones funcionales	136
5.4.-	CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES BILATERALES A	
	LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL	139
5.4.1.-	Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Complejo de Böttinger	139
5.4.2.-	Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral rostral	140
5.4.3.-	Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral caudal	141
5.4.4.-	Consideraciones funcionales	142
5.5.-	CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES A LA MEDULA	
	ESPINAL CERVICAL	142
5.5.1.-	Consideraciones funcionales	143
5.6.-	CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES BILATERALES A	
	LA MEDULA ESPINAL CERVICAL	144
5.6.1.-	Consideraciones funcionales	145
5.7.-	CONSIDERACIONES FUNCIONALES GENERALES	145
6.-	CONCLUSIONES	148
7.-	BIBLIOGRAFIA	153

1.- INTRODUCCION

1.1.- EL SISTEMA RESPIRATORIO: VISION GENERAL

El sistema respiratorio proporciona al medio interno el oxígeno necesario para el mantenimiento del metabolismo celular, o lo que es lo mismo para el mantenimiento de la vida. Al mismo tiempo, el sistema respiratorio se encarga de eliminar el producto de desecho de dicho metabolismo celular, el anhídrido carbónico.

El sistema respiratorio se divide en tres subsistemas, que intervienen a diferentes niveles del acto respiratorio: i) un sistema de intercambio de gases (los pulmones), ii) un sistema de bombeo (la caja torácica y la pared abdominal) y iii) un sistema de válvulas (las vías aéreas superiores). El sistema de bombeo proporciona el flujo de entrada y salida del aire hacia el sistema de intercambio gaseoso; mientras que el sistema de válvulas, mediante su apertura o cierre, modula la eficacia de la bomba controlando la resistencia al flujo de aire (Staub, 1991). Las motoneuronas y músculos del sistema de bombeo están recogidos en el apartado 1.1.1. Las motoneuronas y músculos del sistema de válvulas se describen en el apartado 1.1.2.

1.1.1.- Caja torácica y pared abdominal

La caja torácica constituye el sistema de bombeo del aparato respiratorio. Sus músculos principales se clasifican en: i) músculos inspiratorios, diafragma (Fig. 1) e intercostales externos (Fig. 2A), debido a que su contracción provoca un flujo de entrada de aire y ii) músculos espiratorios, intercostales internos (Fig. 2A) y algunos músculos abdominales (Fig. 2B), ya que su contracción provoca un flujo de salida de aire. Los flujos de entrada y salida de aire de los pulmones son el resultado de la acción mecánica de

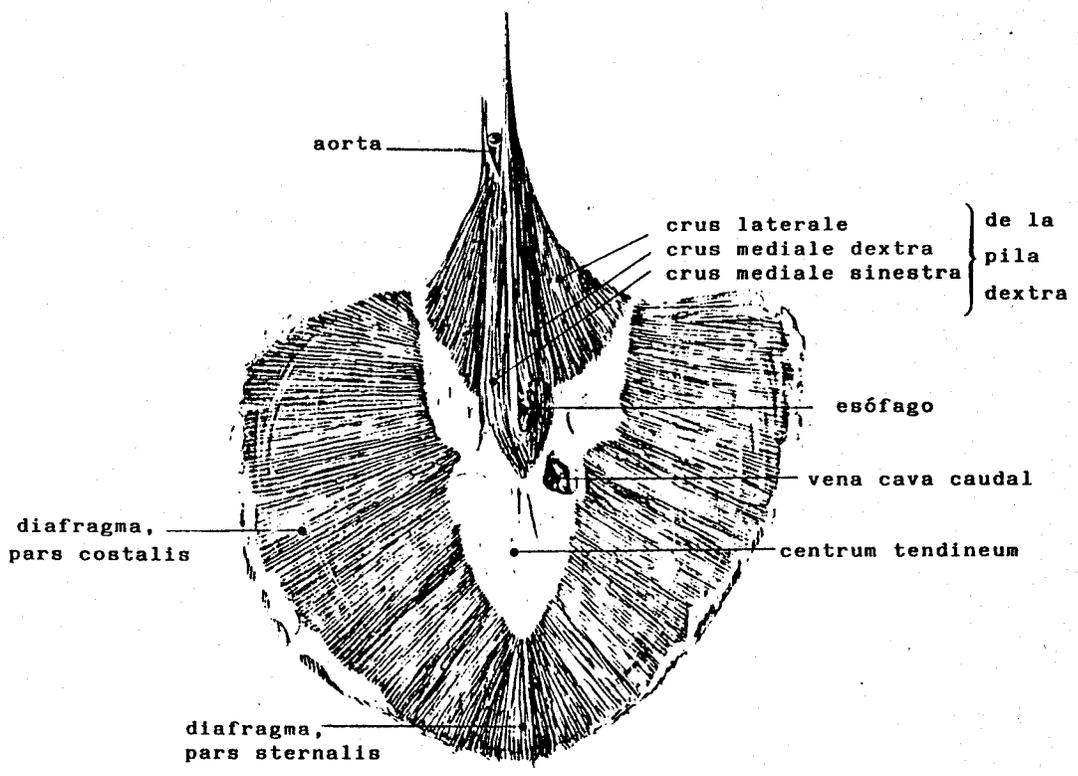


Fig. 1. Esquema en el que se representa el músculo diafragma, superficie abdominal, de la rata (modificado de Hebel y Stromberg, 1986).

dos bombas distintas: i) la bomba axial y ii) la bomba radial (Mead, 1982).

La bomba axial juega un papel fundamental en la generación de los flujos de aire. Esta se activa por la contracción del músculo diafragma, que produce un desplazamiento hacia abajo de la pared torácica. Este hecho, mediante cambios en la presión pleural, provoca la entrada de aire en los pulmones a través de las vías aéreas superiores. Cuando se relaja el diafragma da lugar a la espiración o flujo de salida de aire (Mead, 1982).

La bomba secundaria, denominada bomba radial (Mead, 1982), consiste en la musculatura de la caja torácica y de la pared abdominal. La contracción de algunos de estos músculos puede constituir un acto inspiratorio, ya que da lugar a la elevación de la caja torácica e incremento de la circunferencia de la misma; mientras que la contracción realizada por otros músculos disminuye la circunferencia torácica (o aumenta la presión abdominal) y promueve la espiración. Las dos bombas (axial y radial) no son independientes; ya que están coordinadas por diferentes mecanismos tales como los cambios en la presión abdominal y pleural, la existencia de un programador central y los lazos de retroalimentación centrales y periféricos.

Durante la espiración, el diafragma está inactivo (Sant' Ambroggio y col., 1963) y la contracción de los músculos espiratorios torácicos y abdominales provoca un flujo de salida de aire. Incluso si estos músculos no están activos, la espiración ocurre pasivamente.

1.1.1.1.- *Diafragma*

El diafragma, el principal músculo inspiratorio (Fig. 1), está inervado por los nervios frénicos. Las motoneuronas que envían sus fibras por estos nervios, llamadas motoneuronas frénicas, lo hacen a través de las raíces cervicales de los segmentos C4 a C6 de la médula espinal (Goshgarian y Rafols, 1981). En gatos, dichas motoneuronas forman un denso racimo de células en la lámina IX del asta ventral de la médula espinal cervical caudal (Webber y col.,

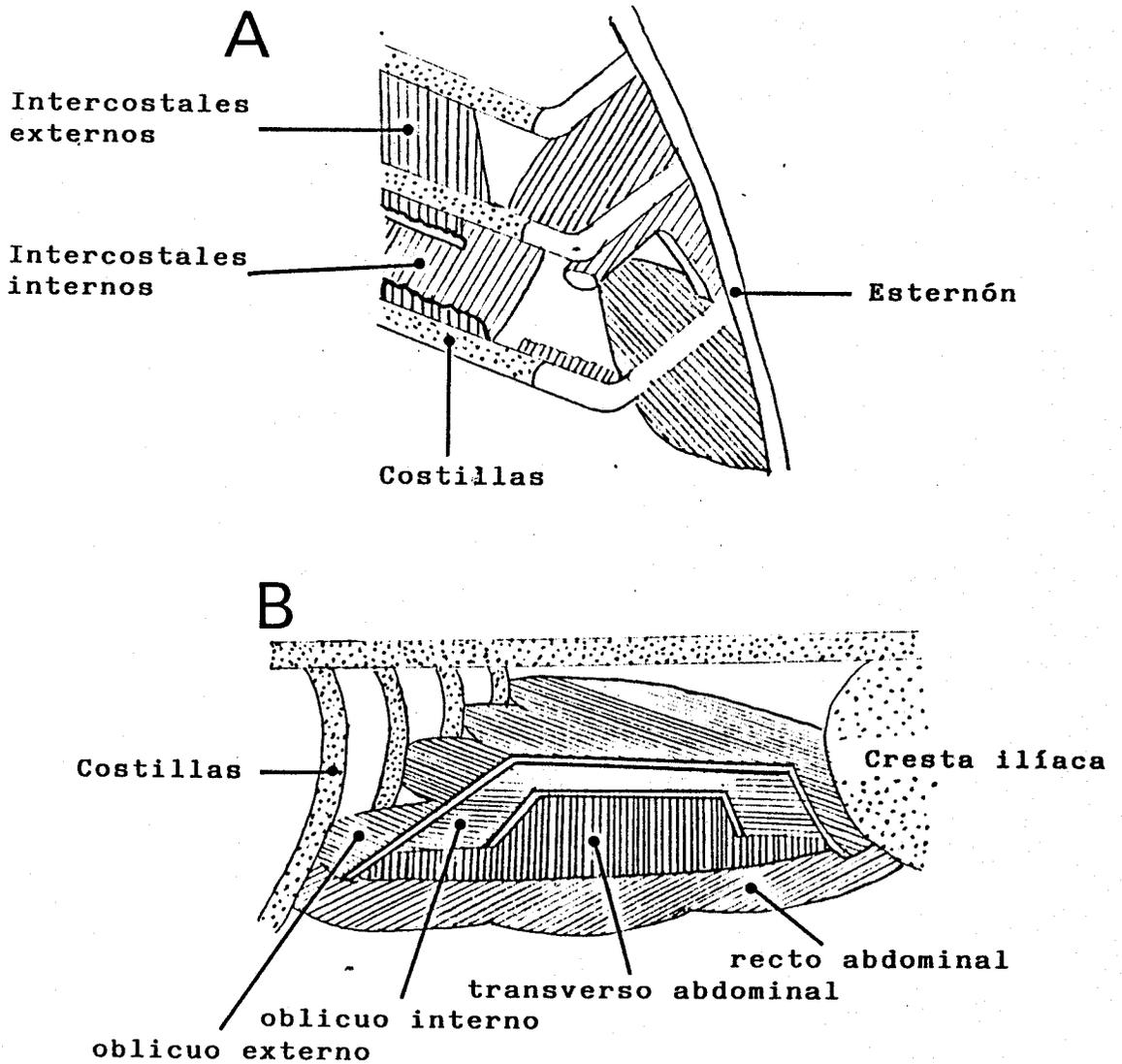


Fig 2. Esquemas ilustrativos en los que se representan la disposición de los músculos respiratorios intercostales (A) y abdominales (B) (modificado de Monteau y Hilaire, 1991).

1979). Dicha localización se ha determinado mediante la inyección intradiafragmática de peroxidasa de rábano. En ratas, utilizando el mismo método de marcaje neuronal por transporte axónico retrogrado, las motoneuronas frénicas se describieron como una columna de células muy bien definida, paralela al eje longitudinal de la médula espinal, entre los grupos de células ventromediales y ventrolaterales. Esta columna de neuronas se extiende desde el tercer al quinto segmento cervical (Kuzuhara y Chou, 1980). En ningún caso se ha encontrado que los axones de las motoneuronas frénicas crucen la línea media (Goshgarian y Rafols, 1981).

1.1.1.2. - *Músculos intercostales*

Los músculos torácicos se consideran implicados en la respiración, ya que su contracción provoca movimientos de la caja torácica y por tanto flujo de aire. La actividad respiratoria de estos músculos es variable, pues depende de cambios posturales, estado de vigilia, mezcla de gases respirados, etc. (Duron, 1981; Megirian y col., 1987).

Los músculos intercostales están dispuestos en dos capas finas (Fig. 2A). Los más superficiales se denominan intercostales externos y los más profundos intercostales internos. Ambos tipos de músculos están insertados entre las costillas, aunque las fibras de uno y otro se sitúan en direcciones opuestas. Los músculos de la capa superficial son inspiratorios; mientras que los de la capa profunda son espiratorios. Los nervios que inervan la musculatura intercostal tienen su origen en dos ramas del nervio ventral espinal (Eccles y col., 1962).

Tras una inyección de peroxidasa de rábano en los músculos intercostales, se encontró que sus motoneuronas se localizan en la médula espinal torácica (Larnicol y col., 1982). En gatos, mediante el marcaje intracelular con peroxidasa de rábano (Lipski y Martin-Body, 1987) se demostró que las motoneuronas de los músculos intercostales internos y externos se encuentran solapadas en el asta ventral, situándose las motoneuronas de los internos menos profundas y más laterales que las de los externos. En la rata,

ambos tipos de motoneuronas ocupan posiciones similares, aunque con un mayor grado de solapamiento que en el gato (Saji y Miura, 1990).

1.1.1.3.- *Músculos abdominales*

La pared abdominal está constituida por cuatro músculos: el oblicuo externo, el oblicuo interno, el transverso abdominal y el recto abdominal (Fig. 2B). La contracción de estos cuatro músculos incrementa la presión interna de la cavidad abdominal y provee la fuerza necesaria para realizar actividades tales como la defecación, la micción, el vómito y el parto, así como la espiración. Esto ocurre así porque la contracción de la pared abdominal, que presiona hacia arriba las vísceras abdominales, provoca que el diafragma se abombe. Este mecanismo actúa durante la espiración, sólo cuando el volumen ventilatorio está aumentado o cuando el retroceso elástico del mecanismo pectoral está debilitado (Staub, 1991).

Los músculos abdominales están inervados por la rama más larga de los nervios espinales torácicos ventral y lumbar. La inyección con peroxidasa de rábano en los músculos abdominales demostró que las motoneuronas del recto abdominal están situadas dorsomediales al grupo de las motoneuronas intercostales externas; mientras que las motoneuronas del músculo oblicuo externo se sitúan laterales dentro del asta ventral, con un solapamiento extenso con el grupo de las motoneuronas de los intercostales externos (Rickard-Bell y col., 1985). Se ha propuesto la distribución segmentaria siguiente, a lo largo de la médula espinal, (Miller y col., 1987) para las poblaciones de las motoneuronas de los músculos respiratorios: recto abdominal, T4-L3; oblicuo externo, T6-L3; transverso abdominal, T9-L3 e oblicuo interno, T13-L3. En secciones transversales de la médula espinal, se observó que las motoneuronas del recto abdominal se encuentran más mediales que las de los otros músculos abdominales, aunque ambas poblaciones están solapadas (Holstege y col., 1987; Miller, 1987).

1.1.2.- Vías aéreas superiores

La contracción de los músculos de la vías aéreas superiores actúa como una válvula que modula, e incluso controla, el flujo de aire generado por la contracción de los músculos de la caja torácica. Pero además, estos músculos sirven para otras muchas funciones de limitada aplicación a la respiración, como son el olfato, la deglución, la termorregulación, la vocalización, la protección del tracto respiratorio inferior, la estabilización del tronco, etc. La nariz, la orofaringe y la laringe son los tres puntos en los que el flujo de aire, que va hacia los pulmones o viene de los pulmones, puede modificarse (Fig. 3). Cada uno de estos puntos tiene distintos músculos cuya contracción controla el diámetro de la apertura a través del cual el flujo ocurre, es decir, cada uno de estos puntos modifica la resistencia al flujo de aire (Staub, 1991).

La apertura nasal se puede cambiar por una serie de músculos. El más importante de ellos es el músculo elevador de la aleta nasal, que actúa como un dilatador nasal aumentando el orificio de entrada o salida de aire (Iscoe, 1988).

La abertura orofaríngea se modula por distintos músculos, algunos de los cuales tienen un papel destacado en la masticación o en la deglución. Los músculos se agrupan de acuerdo con la estructura que controlan. El estilogloso, hiogloso y geniogloso actúan sobre la lengua; los dos primeros retraen la lengua y el último, actúa como proyector de la lengua. Entre los músculos que accionan la faringe hay que destacar las partes caudal, medial y craneal de los constrictores faríngeos (Fig. 4). Dos músculos pequeños, el glossofaríngeo y el estilofaríngeo, también afectan la apertura faríngea. El primero así como el constrictor faríngeo contrae la faringe; mientras que el estilofaríngeo la dilata. Otra pareja importante de músculos es la formada por el músculo elevador del paladar blando y el músculo tensor del velo palatino. El músculo elevador del paladar alza el paladar; mientras que el músculo tensor del paladar mantiene el paladar blando alejado de la pared faríngea, lo que permite la respiración nasal. Los músculos que se insertan en los huesos del aparato hioideo (Fig. 5) son el

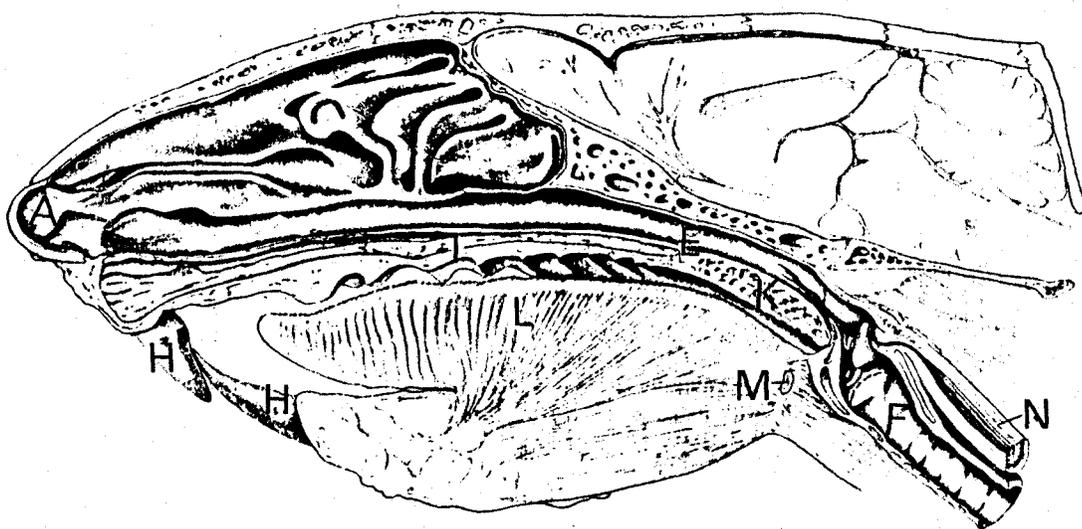


Fig. 3. Esquema ilustrativo de una sección longitudinal de la cabeza de la rata, en el que se muestra la localización de las vías aéreas superiores. A, vestíbulo nasal; E, faringe; F, laringe; H, dientes incisivos; I, paladar duro; K, paladar blando; L, lengua; M, hueso hioideo; N, esófago (modificado de Hebel y Stromberg, 1986).

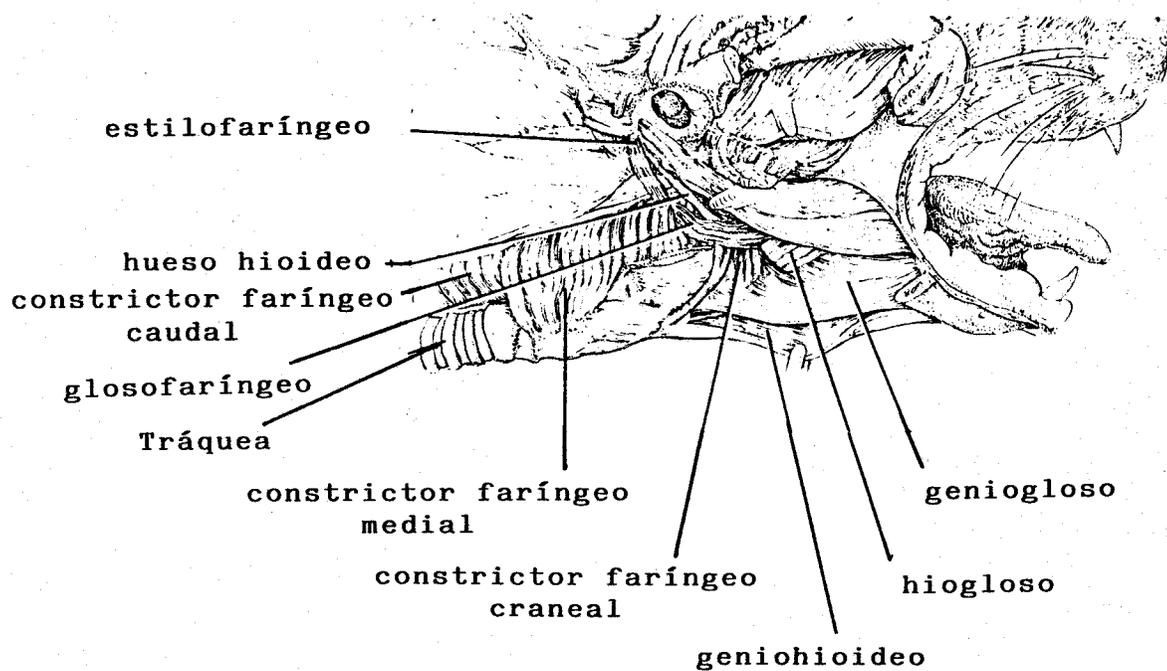
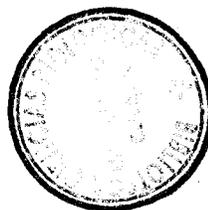


Fig. 4. Esquema ilustrativo de una visión lateral de la musculatura faríngea del gato (modificado de Crouch, 1969).



estilohioideo, geniohioideo y el milohioideo. Estos músculos, junto con el estilogloso e hiogloso, pueden mover el aparato hioideo cranealmente. El tirohioideo, esternohioideo y el jugulohioideo tiran del aparato hioideo en dirección dorsal, caudal o en ambas direcciones simultáneamente. Los restantes músculos de las vías aéreas superiores actúan sobre la laringe y se clasifican en extrínsecos e intrínsecos de la misma. Los músculos extrínsecos laríngeos anclan la laringe en el cuello: constrictores faríngeos, unidos al estilofaríngeo, estilogloso y esternotiroideo. Los músculos intrínsecos de la laringe controlan el calibre de la glotis o tensión de las cuerdas vocales (Fig. 6). El cricoaritenoidio posterior actúa sinérgicamente con el cricotiroideo como músculos abductores o dilatadores de la laringe. El cricoaritenoidio lateral, interaritenoidio y tiroaritenoidio son adductores (cierran la laringe) (revisión de Iscoe, 1988).

1.1.2.1.- *Musculatura nasolabial*

La musculatura nasolabial está innervada por el nervio facial. Las motoneuronas se localizaron tras la inyección intramuscular de peroxidasa de rábano en la subdivisión lateral del núcleo facial (Bystrzycka y Nail, 1983).

1.1.2.2.- *Musculatura lingual*

Las motoneuronas que innervan la musculatura lingual se encuentran en el núcleo hipogloso del bulbo. Dicho núcleo posee una organización topográfica en la rata (Krammer y col., 1979), el gato (Lowe, 1978; Miyazaki y col., 1981; Uemura y col., 1979), el perro (Chibuzo y Cummings, 1982), y el mono (Uemura-Sumi y col., 1981). En el gato y en la rata, el núcleo hipogloso se divide en los subnúcleos ventral y dorsal. El subnúcleo ventral innerva los músculos geniogloso y geniohioideo, a través de la rama medial del hipogloso. Estos dos músculos actúan como proyectores de la lengua. La división dorsolateral innerva los retractores de la lengua, el hiogloso y el estilogloso, a través de la rama lateral del hipogloso. El nervio del tirohioideo (músculo del aparato hioideo) tiene su origen en la porción caudal del nervio hipogloso y en el

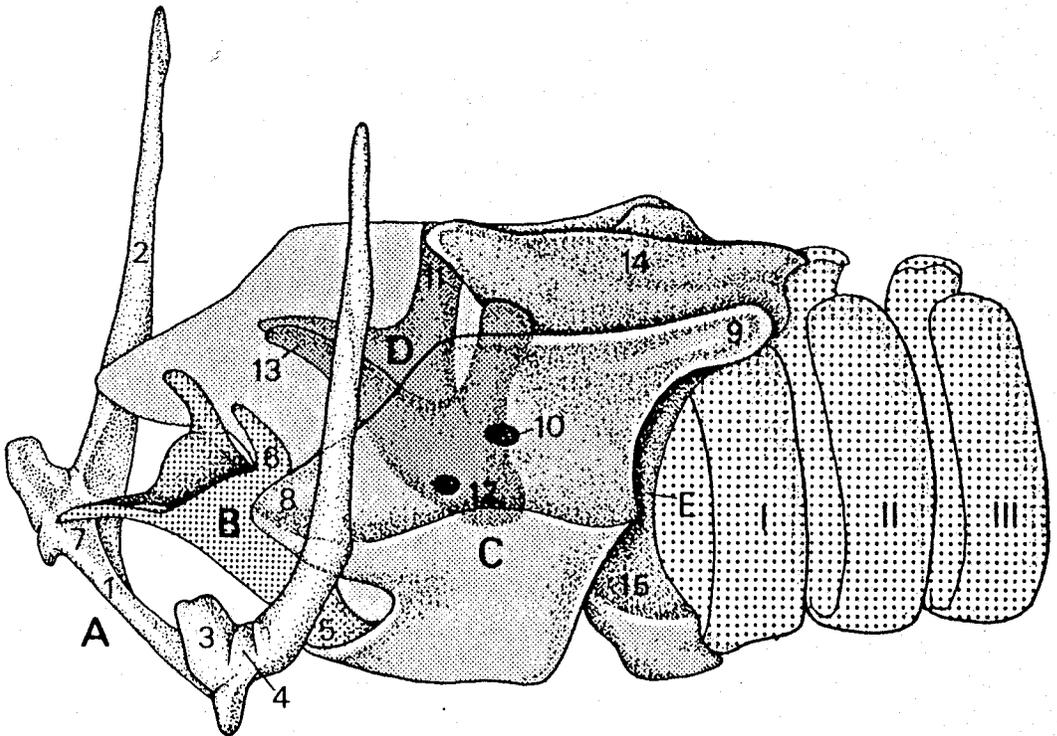


Fig. 5. Esquema ilustrativo de una visión rostralateral del hueso hioideo y de los cartílagos laríngeos. A, hueso hioideo; 1, basihioideo; 2, tirohioideo; 3, ceratohioideo; 4, cartílagos intercares; B, epiglotis; 5, base; 6, proceso cuneiforme; 7, ápice de la epiglotis; C, cartílago tiroideo; 8, cuerno rostral; 9, cuerno caudal; 10, foramen tiroideo; D, cartílago aritenoides; 11, procesos musculares; 12, procesos vocales; 13, procesos corniculares; E, cartílago cricoideo; 14, lámina; 15, arco; I-III, primeros cartílagos traqueales (modificado de Hebel y Stromberg, 1986).

asta ventral de la médula espinal cervical (C1) (Miyazaki y col., 1981).

1.1.2.3.- *Musculatura faríngea*

En el gato, los músculos faríngeos, incluyendo el estilofaríngeo, están inervados por motoneuronas situadas a lo largo del eje rostrocaudal del núcleo Ambiguo (Nomura y Mizuno, 1982; Yoshida y col., 1980, 1981). Los axones de dichas motoneuronas abandonan el bulbo a través del tronco cervical del nervio glosofaríngeo, en el caso del músculo estilofaríngeo, y a través de las ramas faríngeas del vago, en el caso de los músculos constrictores de la faringe. Las motoneuronas estilofaríngeas se localizan en la porción más rostral del núcleo Ambiguo (también denominado núcleo Retrofacial), ocupando posiciones incluso dorsales al núcleo facial (Bieger y Hopkins, 1987; Loveren y col., 1985). Tanto en el gato como en la rata, las motoneuronas de los constrictores faríngeos están localizadas en el núcleo Ambiguo, desde los niveles del óbex (unión del canal central con el cuarto ventrículo) hasta justo caudal al núcleo facial (Bieger y Hopkins, 1987; Yoshida y col., 1980, 1981). En estos últimos trabajos se puso de manifiesto el solapamiento existente entre las motoneuronas que inervan los distintos músculos faríngeos. Las motoneuronas del músculo elevador del paladar, cuyos axones van por el nervio vago o posiblemente por el nervio glosofaríngeo (revisión bibliográfica de Keller y col., 1984), se sitúan dentro de la porción más rostral del núcleo Retrofacial (Loveren y col., 1983; Keller y col., 1984). Las motoneuronas del músculo tensor del velo del paladar, cuyos axones van por el nervio trigémino, se localizan en los dos tercios rostrales de la división ventromedial del núcleo motor del trigémino espinal.

1.1.2.4.- *Musculatura laríngea*

Las motoneuronas de los músculos intrínsecos de la laringe se localizan a todo lo largo del eje rostrocaudal del núcleo Ambiguo, incluyendo su parte más rostral o núcleo Retrofacial y su parte más caudal, cercano a la médula espinal cervical. En la rata, se han

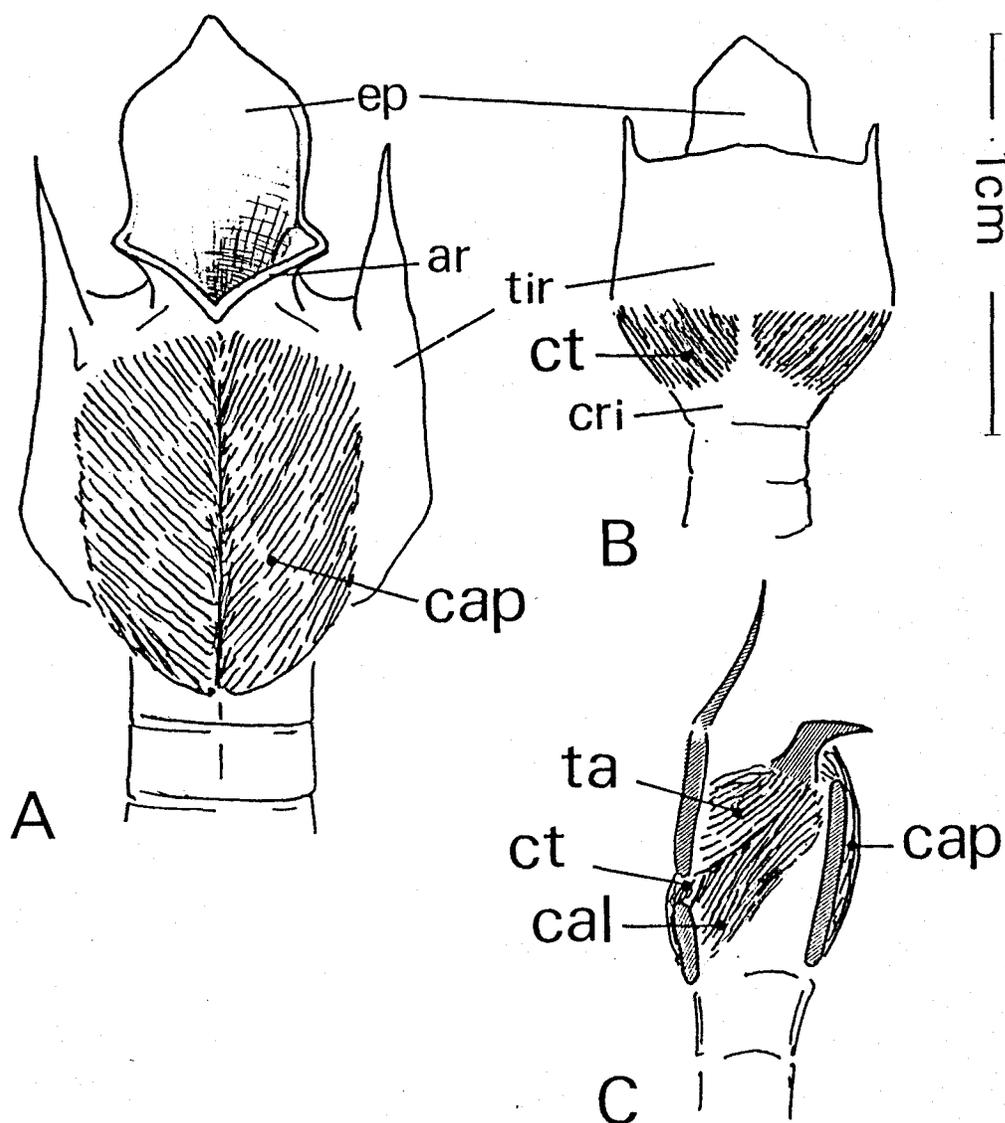


Fig. 6. Esquema ilustrativo de la laringe de la rata, mostrando la disposición de los diferentes músculos intrínsecos de la misma. A, vista dorsal; B, vista ventral; C, corte longitudinal. Abreviaturas: ar, cartílago aritenoides; cri, cartílago cricoides; cal, músculo cricoaritenoso lateral; cap, músculo cricoaritenoso posterior; ct, músculo cricotiroideo; ep, epiglotis; ta, músculo tiroaritenoso; tir, cartílago tiroideo (tomado de Portillo, 1986).

realizado estudios mediante la inyección de peroxidasa de rábano (Hinrichsen y Ryan, 1981; Lobera y col., 1981; Pásaro y col., 1981 Yoshida y col., 1982), el gato (Davis y Nail, 1984; Gacek, 1975; Lobera y col., 1981; Pásaro y col., 1983; Yoshida y col., 1982), el conejo (Davis y Nail, 1984), el murciélago (Schweizer y col., 1981), el perro (Wallach y col., 1983), y el mono (Yoshida y col., 1984, 1985). Estos estudios han arrojado una gran cantidad de información acerca de la localización precisa de dichas motoneuronas. Así, se conoce que las motoneuronas del músculo cricotiroideo, cuyos axones van por el nervio laríngeo superior, están situadas más rostralmente en el núcleo Ambiguo, seguidas por las motoneuronas del cricoaritenoido lateral; mientras que las motoneuronas del tiroaritenoido y del cricoaritenoido posterior coexisten en las porciones más caudales del núcleo Ambiguo (Portillo y Pásaro, 1988a). En monos (Yoshida y col., 1985) existe una organización espacial de las motoneuronas laríngeas en el plano coronal dentro del núcleo Ambiguo; ya que las motoneuronas del cricoaritenoido posterior ocupan posiciones más mediales, respecto de las del cricoaritenoido lateral que se ubican más centralmente y de las del tiroaritenoido que se localizan más lateralmente. Las motoneuronas del cricotiroideo, sin embargo, se sitúan alrededor de todas las anteriormente descritas. También existe una separación entre las motoneuronas abductoras y adductoras, ya que las primeras están ubicadas más rostrales y ventrales dentro del propio núcleo Ambiguo (Davis y Nail, 1984; Gacek, 1975; Hisa, 1984).

1.2.- AREAS NEURONALES GENERADORAS DEL PATRON RESPIRATORIO

Las motoneuronas respiratorias se caracterizan por presentar un patrón de descarga, bien de forma continua o de forma esporádica, relacionado con alguna de las fases de la respiración. Dichas motoneuronas reciben proyecciones directas desde neuronas respiratorias centrales, o neuronas premotoras, encargadas de proporcionarles la información del generador central del ritmo respiratorio. El origen de la ritmicidad respiratoria es un problema fascinante, aún hoy en día no resuelto, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados en los últimos años (Cohen, 1979; Euler, 1983; 1986; Ezure, 1990; Long y Duffin, 1984, 1986; Monteau y Hilaire, 1991; Richter, 1982). Desde finales del siglo pasado, el

concepto de organización y función de los mecanismos responsables de la generación del ritmo respiratorio ha ido aumentando en complejidad. Los primeros experimentos de ablación (Flourens, 1842; LeGallois, 1812; Markwald, 1888) localizaron el generador del ritmo respiratorio en la porción caudal del tronco del encéfalo, (bulbo raquídeo y protuberancia) (Lumsden, 1922a y b; Pitts y col., 1939a, b y c; Pitts, 1946), ya que el patrón eupneico (respiración normal) se mantuvo después de la sección a cualquier nivel rostral al borde caudal de los colículos inferiores (Lumsden, 1923a y b; Wang y col., 1957). Estos primeros estudios documentaron la base, desde un punto de vista tradicional, de la existencia de un multicentro implicado en la génesis del ritmo respiratorio (Lumsden, 1923a y b; Pitts y col., 1939a, b y c; Pitts, 1946), que se ha venido usando para muchas de las investigaciones en años posteriores.

Durante los últimos treinta años, las neuronas respiratorias se han estudiado intensamente usando técnicas de registro extra- o intracelular de la actividad neuronal; técnicas morfológicas, tales como el transporte axónico retrógrado de marcadores neuronales (peroxidasa de rábano); microestimulación y mapeo antidrómico, etc; así como nuevos métodos electrofisiológicos: correlación cruzada, medidas de latencia antidrómica y promediado de espigas de potenciales intracelulares. El objetivo común de dichos estudios ha sido el de explicar la generación del ritmo respiratorio y determinar cómo se procesan las entradas sensoriales y otras entradas en los centros generadores de la ritmicidad respiratoria para producir una respuesta motora.

1.2.1.- Neuronas respiratorias

Por definición, hay dos fases básicas en el ciclo respiratorio: la fase inspiratoria (I) y la fase espiratoria (E). La fase durante la cual el flujo de aire entra en los pulmones se denomina fase inspiratoria y la fase durante la cual el flujo de aire sale de los pulmones recibe el nombre fase espiratoria. En los experimentos electrofisiológicos, estas dos fases se definen usualmente según la actividad del nervio frénico. La fase inspiratoria, por tanto, es el período desde el inicio de la actividad del nervio frénico hasta su pico máximo de actividad y la

fase espiratoria el período desde el pico de máxima la actividad del nervio frénico hasta el inicio, de nuevo, de la actividad del nervio frénico, incluyendo el periodo de silencio (Fig. 7). Esta definición puede que no se corresponda exactamente con la basada en el flujo de aire; sin embargo, al estar apoyada en la actividad del nervio frénico refleja los mecanismos neuronales de forma más directa que los flujos de aire. Estos están determinados no sólo por factores neuronales, sino también por las propiedades mecánicas de la pared torácica y de las vías aéreas (Staub, 1991).

La fase espiratoria puede dividirse a su vez en dos subfases: espiratoria 1 (E1) y espiratoria 2 (E2). La fase E1 se corresponde con el período temprano de la fase espiratoria, en el cual todavía hay descargas postreras en la actividad frénica (Gesell y White, 1938) y la fase E2 con el período de silencio de la actividad del nervio frénico. La fase E1 también se denomina fase "postinspiratoria" (Gauthier y col., 1973; Prabhakar y col., 1986; Richter, 1982) (Fig. 7). Se pueden encontrar dos tipos básicos de neuronas respiratorias, uno constituido por las neuronas inspiratorias que disparan durante la fase inspiratoria del ciclo respiratorio y otro correspondiente a las neuronas espiratorias que disparan en la fase espiratoria. Las neuronas respiratorias cuya actividad abarca ambas fases (I y E) se denominan neuronas de "fase expandida" (el término "fase expandida" hace referencia a un patrón de descarga que no se puede asociar a una de las fases del ciclo respiratorio, pero que presenta un incremento en la descarga durante la inspiración y un decremento durante la espiración o viceversa). Ambas poblaciones (inspiratorias y espiratorias) presentan tres tipos básicos de patrones de disparo o trayectorias del potencial de membrana (Berger, 1981; Cohen, 1979):

i) El primer tipo manifiesta un patrón de disparo en aumento. Las neuronas respiratorias que pertenecen a este tipo incrementan su disparo en forma de rampa y alcanzan el pico máximo de la frecuencia de disparo cerca del final de la fase inspiratoria. Estas neuronas se denominan neuronas inspiratorias de pico tardío o inspiratorias en aumento. A lo largo del presente trabajo se designaran como neuronas tipo I-A.

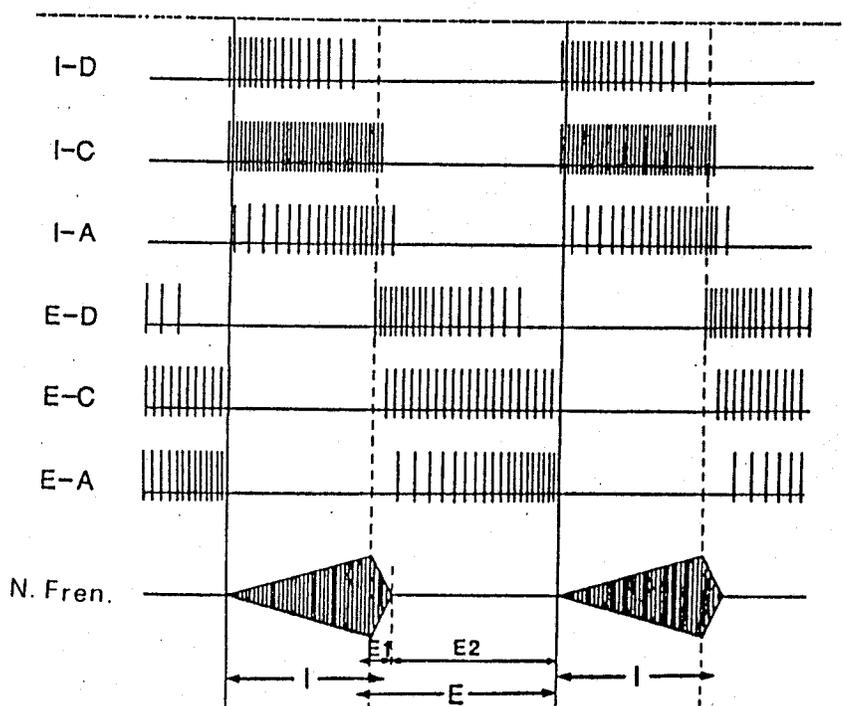


Fig. 7. Tipos básicos de patrones de disparo de las neuronas respiratorias. Las fases inspiratoria (I), espiratoria (E), período temprano de la fase espiratoria (E1) y período tardío de la fase espiratoria (E2) están definidos en función de la actividad del nervio frénico (N. Fren.). I-D: neuronas inspiratorias con patrón de descarga con decremento; I-C: neuronas inspiratorias con patrón de descarga continuo; I-A: neuronas inspiratorias con patrón de descarga con aumento; E-D, E-C y E-A: los mismos patrones de descarga definidos para las neuronas espiratorias (modificado de Ezure, 1990).

ii) En el segundo tipo, la descarga neuronal se inicia al comienzo de la fase inspiratoria con una alta frecuencia de disparo que declina gradualmente. Tales neuronas se denominan neuronas de disparo rápido, de pico temprano o neuronas inspiratorias con decremento (neuronas tipo I-D).

iii) El tercer tipo es el de las neuronas de disparo constante o tipo meseta, cuya descarga comienza al principio de la fase inspiratoria y permanece constante durante toda esta fase (neuronas tipo I-C).

iv) Los tres subtipos en los que se clasifican las neuronas inspiratorias pueden observarse también las neuronas espiratorias: neuronas espiratorias con patrón de disparo con decremento (neuronas tipo E-D; también denominadas postinspiratorias), neuronas espiratorias con patrón de disparo constante (neuronas tipo E-C); y neuronas espiratorias con patrón de disparo en aumento (neuronas tipo E-A).

Los seis tipos básicos de descarga neuronal respiratoria no tienen la misma importancia en la génesis respiratoria, ni se encuentran en la misma proporción. Por ejemplo, no hay ninguna evidencia que sugiera que las neuronas E-C jueguen algún papel en la generación del ritmo respiratorio (Fig. 7) (Ezure, 1990).

1.2.2.- Localización de las neuronas respiratorias

Durante los últimos 50 años, la actividad neuronal respiratoria se ha asociado con los aspectos dorsomediales y ventrolaterales del bulbo raquídeo y de la protuberancia dorsal (Achard y Bucher, 1954; Amoroso y col., 1951; Batsel, 1964; Baumgarten y col., 1957; Gesell y col., 1936; Gesell, 1940). Estudios anatómicos y electrofisiológicos de estas regiones del tronco del encéfalo han logrado identificar más específicamente la localización y los tipos de neuronas respiratorias (Figs. 8 y 9). Para facilitar el examen de estas neuronas respiratorias y su relación con la generación de la ritmicidad respiratoria, es necesario definir la anatomía y fisiología de dichas poblaciones neuronales.

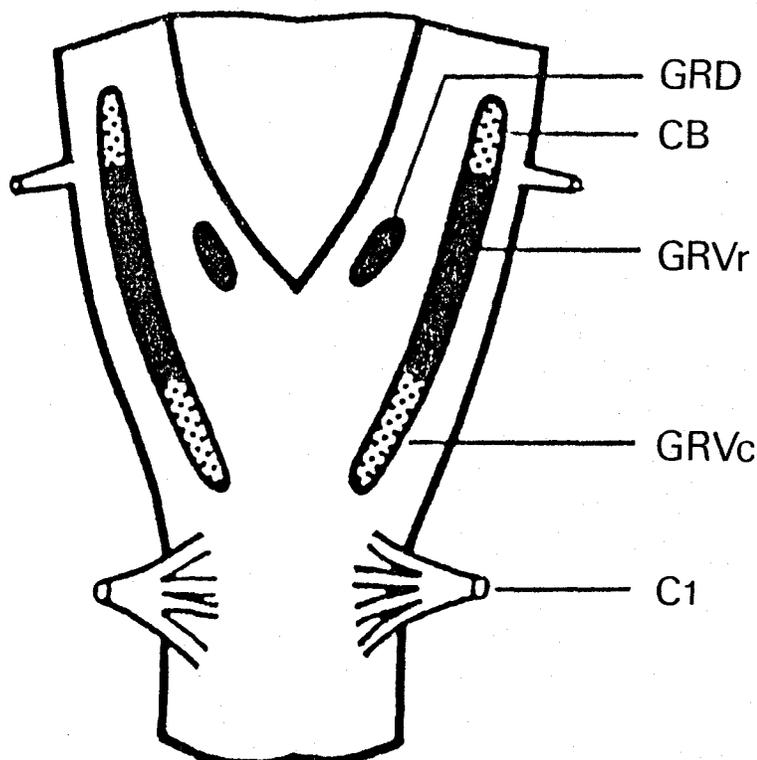


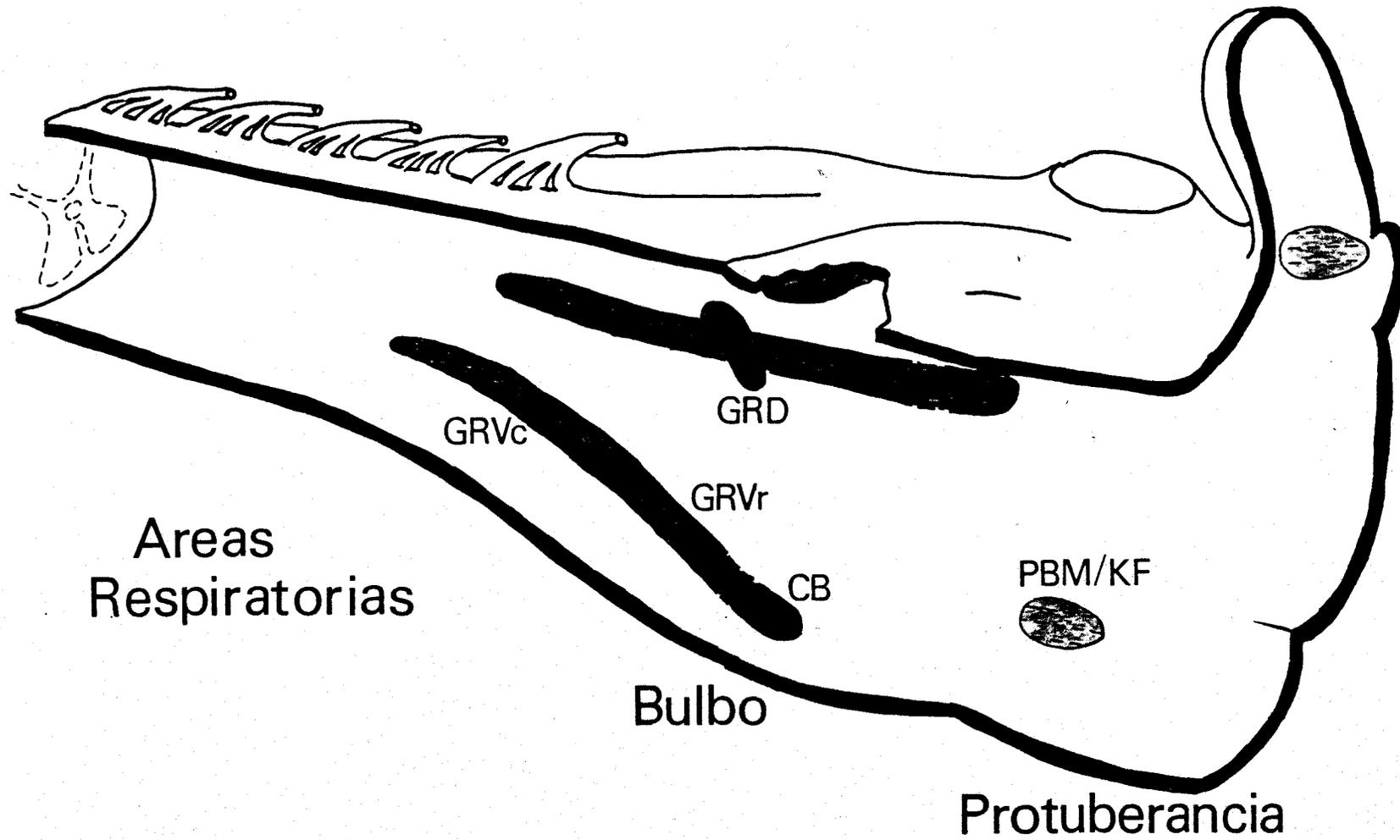
Fig 8. Esquema ilustrativo de una visión dorsal del bulbo del gato en el que se muestra la localización de los grupos de neuronas respiratorias bulbares. La columna ventrolateral, referida como Grupo Respiratorio Véntral (GRV), se extiende desde una zona próxima a las primeras raíces cervicales (C1) hasta el nivel donde comienza el núcleo facial. El área punteada, caudal al óbex, representa el Grupo Respiratorio Ventral caudal (GRVc); el área sombreada, situada entre el óbex y el comienzo del núcleo retrofacial, representa el Grupo Respiratorio Ventral rostral (VRGr) y la parte punteada, más rostral, constituye el complejo de Bötzing (CB). La población dorsomedial de neuronas respiratorias se sitúa en la región ventrolateral del tracto Solitario y constituye el Grupo Respiratorio Dorsal (GRD) (Modificado de Monteau e Hilaire, 1991).

1.2.2.1.- Centro neumotáxico

En gatos vagotomizados se ha encontrado un gran número de neuronas respiratorias en la protuberancia rostral dorsolateral (Bertrand y Hugelin, 1971; Bertrand y col., 1973, 1974). Sin embargo, el número de neuronas que exhiben un ritmo respiratorio se reduce drásticamente si los nervios vagos permanecen intactos (Feldman y col., 1976). No obstante, en experimentos realizados en el gato despierto y con los vagos intactos, se registraron neuronas con ritmo respiratorio en la protuberancia (Sieck y Harper, 1980, 1981). En animales anestesiados, la destrucción de esta región, clásicamente identificada como centro neumotáxico (Lumsden, 1923a y b), da lugar a un elentecimiento, a un patrón respiratorio más profundo (Bertrand y Hugelin, 1971; Bertrand y col., 1974; Euler y col., 1976; Feldman y Gautier, 1976; Knox y King, 1976); si además, el animal se vagotomiza bilateralmente el patrón respiratorio se hace apneúxico (jadeo inspiratorio: inspiraciones más profundas y disminución de la frecuencia respiratoria). Sin embargo, en preparaciones crónicas con animales vagotomizados bilateralmente y con los centros neumotáxicos lesionados se presenta una respiración apneúmica bajo anestesia y los animales recuperan eventualmente un patrón eupnéico (respiración con un patrón normal) en condiciones de vigilia (St. John y col., 1972). Estas observaciones argumentan en contra del papel primordial de las neuronas de la protuberancia rostral en la generación del ritmo respiratorio.

El centro neumotáxico, o más recientemente complejo neumotáxico, está constituido por dos núcleos de la protuberancia, el núcleo parabraquial medial y, ventrolateral a éste, el núcleo de Kölliker-Fuse. Este último posee una predominancia de neuronas inspiratorias con descarga fásica (Cohen, 1958; Takagi y Nakayama, 1958); mientras que el primero contiene neuronas inspiratorias, espiratorias y neuronas de "fase expandida" (Fig. 9).

Fig. 9. Esquema ilustrativo del bulbo y la protuberancia en el que se representan las distintas áreas con mayor densidad de neuronas respiratorias: Grupo Respiratorio Ventral (GRV) en el bulbo ventrolateral (rojo); Grupo Respiratorio Dorsal (GRD) (azul), asociado al subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario, en el bulbo dorsomedial y centro neumotáxico, situado en la protuberancia, constituido por los núcleos parabraquial medial (PBM) y de Kölliker-Fuse (KF) (amarillo). El GRV posee, a su vez, tres subdivisiones morfofuncionales: GRV caudal (GRVc), GRV rostral (GRVr) y Complejo de Bötzing (CB).



Entre estos núcleos pontinos y los principales núcleos respiratorios bulbares existen numerosas conexiones (Denavit-Saubié y Riche, 1977; Kalia, 1977; King, 1980; St. John, 1982). Estas conexiones, junto con el conocimiento de que la estimulación eléctrica de estas regiones puede provocar una terminación prematura de la fase respiratoria en curso (cambiando la inspiración a espiración y *viceversa*) (Cohen, 1971; Euler y Trippenbach, 1976; Feldman y Gautier, 1976), dió lugar a la hipótesis de que los núcleos respiratorios pontinos rostrales pueden actuar "afinando el tono del patrón respiratorio" (Long y Duffin, 1986).

1.2.2.2.- Centro apneúsico

La idea de un centro apneúsico en la protuberancia caudal que facilitase la inspiración y la apneusis, si se le liberase de las influencias de los núcleos pontinos rostrales y de los aferentes vagales, se propuso originalmente para explicar los resultados de los experimentos de transección (Hukuhara, 1973; Wang y col., 1957). Sin embargo, tras numerosas exploraciones con microelectrodos no ha quedado definida dicha región respiratoria (Achard y Bucher, 1954; Cohen y Wang, 1959; Hukuhara y col., 1954; Kahn y Wang, 1966; Ngai y Wang, 1957; St. John y Wang, 1977). Sears (1977) sugirió que la apneusis es un estado funcional del sistema, en el que toma parte el sistema reticular activador más que la acción de un centro apneúsico. Así pues, según esta hipótesis, la facilitación de la inspiración y la producción de apneusis sería una función del sistema reticular activador y no del generador del ritmo respiratorio.

1.2.2.3.- Grupo Respiratorio Dorsal

Baumgarten y colaboradores (1957) identificaron una concentración de neuronas inspiratorias en la zona dorsomedial del bulbo del gato. Esta población de neuronas inspiratorias, referida como Grupo Respiratorio Dorsal (Averill y col., 1984; Berger, 1977; Berger y col., 1984; Graham y Duffin, 1982, 1985; Lipski y col., 1979; Merrill y col., 1983) se ha localizado anatómicamente en la

porción ventrolateral del núcleo del tracto Solitario (Baumgarten y col., 1957) (Fig. 9). En esta zona se han descrito dos tipos de neuronas inspiratorias (Baumgarten y Kanzow, 1958), en función de su respuesta a la manipulación del volumen pulmonar: la insuflación pulmonar inhibe las células respiratorias alfa ($R\alpha$), mientras que excita a las células respiratorias beta ($R\beta$), vía conexión excitatoria monosináptica entre las células $R\beta$ y los receptores de estiramiento pulmonar de adaptación lenta (Averill y col., 1984). Funcionalmente, ambos tipos neuronales (con patrón de descarga I-A) se han identificado como una fuente de proyección monosináptica de las motoneuronas inspiratorias espinales (frénicas e intercostales externas) (Fedorko y col., 1983; Lipski y col., 1983; Lipski y Duffin, 1985). La terminología $I\alpha$ e $I\beta$ también se usa en la literatura para denominar a las células $R\alpha$ y $R\beta$, respectivamente (Mitchell y Berger, 1975).

En estudios recientes se registró, así mismo, actividad espiratoria en la vecindad del núcleo del tracto Solitario (Berger, 1977; Euler y col., 1973; Feldman y Cohen, 1978). Sin embargo, esta actividad parece ser el registro electrofisiológico de los axones de paso procedentes de las motoneuronas laríngeas espiratorias del núcleo Ambiguo, que siguen una trayectoria dorsomedial y a la altura del núcleo del tracto Solitario hacen un giro para volver hacia atrás y salir por el nervio vago (Pásaro y col., 1983), o de los axones de las neuronas espiratorias del complejo de Bötzing (Merrill y col., 1983; Richter y col., 1979). Además, dentro de este grupo, ventrolateral y ventromedial del tracto Solitario, existe un subgrupo de neuronas denominadas células bomba, o células P, que descargan como consecuencia de las entradas monosinápticas excitadoras desde los receptores de estiramiento pulmonar (Averill y col., 1984; Berger, 1977; Cohen y Feldman, 1984; Donoghue y col., 1985). A diferencia de lo que ocurre con las $R\alpha$ y las $R\beta$, las células P no parecen estar inhibidas activamente durante la fase espiratoria (Cohen y Feldman, 1984), o tener proyecciones espinales (Berger, 1977). Así pues, las células P pueden ser interneuronas implicadas en la transmisión de la información de los receptores de estiramiento pulmonar (más detalles en el apartado 1.2.4.1) (Averill y col., 1984; Berger, 1977; Bowden y Duffin, 1980; Donoghue y col., 1985; Lipski y col., 1979).

1.2.2.4.- *Grupo Respiratorio Ventral*

En la zona ventrolateral del bulbo se localiza una concentración de neuronas respiratorias asociada al núcleo Ambiguo. El Grupo Respiratorio Ventral (GRV) se describió originalmente por Achard y Bucher (1954) y Batsel (1964), y posteriormente por Merrill (1970, 1974) y Bianchi (1971, 1974) como una columna de neuronas respiratorias, ligeramente lateral al núcleo Ambiguo, cuyo borde caudal está próximo a las primeras raíces cervicales (C1) (Figs. 8 y 9). A diferencia del núcleo Ambiguo, que posee predominantemente motoneuronas vagales y glossofaríngeas (Lawn, 1966a y b), en esta columna de neuronas predominan las neuronas bulboespinales (neuronas que envían su axón hacia la médula espinal y que hacen contacto sináptico con las motoneuronas, es decir neuronas premotoras) y propiobulbares (neuronas respiratorias que no envían su axon a la médula espinal o a los nervios craneales). El GRV se encuentra dividido en el eje rostrocaudal, atendiendo a las propiedades electrofisiológicas de las neuronas que lo componen, en tres subgrupos principales: GRV caudal, GRV rostral y Complejo de Bötzing (Fig. 8).

1.2.2.4.1.- Grupo Respiratorio Ventral caudal

El GRV caudal se extiende desde las primeras raíces cervicales hasta el óbex. En la literatura, este área se designa también con el nombre de núcleo Retroambiguo, así descrito primeramente por Olszewski y Baxter (1954). El GRV caudal consiste en una población de neuronas bulboespinales espiratorias (tipo E-A), fuente de información excitatoria para las motoneuronas espiratorias espinales (intercostales internas y abdominales) (Kirkwood y Sears, 1973; Lipski y Merrill, 1983; Sears y col., 1985).

1.2.2.4.2.- Grupo Respiratorio Ventral rostral

Este grupo se corresponde con la zona intermedia del GRV, extendiéndose, en la rata, desde los niveles del óbex (donde solapa con el GRV caudal) hasta aproximadamente 1,5 mm más rostrales (comienzo del núcleo Retrofacial). También se ha denominado este grupo como núcleo Retroambiguo rostral (Merrill, 1970, 1974) o núcleo Para-Ambiguo (Kalia, 1981). El GRV rostral posee numerosas neuronas bulboespinales inspiratorias, con propiedades electrofisiológicas similares a las del Grupo Respiratorio Dorsal, que son una fuente de proyección monosináptica para las motoneuronas inspiratorias espinales (frénicas e intercostales externas) (Bianchi, 1971; Fedorko y col., 1989; Hilaire y Monteau, 1976; Merrill, 1970). Además, en este área se han descrito varias subpoblaciones de neuronas propiobulbares respiratorias, con diferentes patrones de actividad (revisión de Ezure, 1990). Por su importancia destacan las neuronas con patrón de descarga I-D (también designadas "inspiratorias tempranas") y las de tipo E-D (también denominadas "postinspiratorias") (Ballantyne y Richter, 1982; Bianchi, 1971, 1974; Merrill, 1972, 1974; Richter y Ballantyne, 1981, 1983). Se ha demostrado que las neuronas tipo I-D serían la fuente de inhibición para las neuronas espiratorias medulares (tipo E-D y E-A) (Merrill, 1972, 1974, 1979; Richter, 1982; Richter y Ballantyne, 1981, 1983). De forma similar, las neuronas tipo E-D serían una de las fuentes de inhibición de la mayoría de las neuronas inspiratorias medulares (I-D, I-C e I-A) (Ballantyne y Richter, 1982, 1985; Richter, 1982; Richter y Ballantyne, 1981, 1983). El papel desempeñado por la pareja de interneuronas, tipo I-D y tipo E-D, se discutirá en el apartado 1.2.3.

1.2.2.4.3.- Complejo de Bötzinger

El Complejo de Bötzinger se corresponde con un área situada ventromedial al núcleo Retrofacial (porción rostral del núcleo Ambiguo), cuyo borde rostral se sitúa justo caudal al núcleo facial (Kalia y col., 1979; Lipski y Merrill, 1980). En esta población, constituida principalmente por neuronas espiratorias (Lipski y Merrill, 1980; Merrill y col., 1983), destacan las neuronas tipo

E-A. Este tipo de neuronas E-A, muy distintas a las de tipo E-A del GRV caudal, provee de entradas inhibitorias a las motoneuronas frénicas y a las neuronas inspiratorias del Grupo Respiratorio Dorsal y GRV rostral durante la fase espiratoria (Fedorko y Merrill, 1984b; Merrill y col., 1983; Merrill y Fedorko, 1984). Aunque en este grupo también se han descrito neuronas inspiratorias tipo I-D y espiratorias tipo E-D (Bianchi y Barillot, 1982), no está claro aún si estas neuronas se registraron en el borde rostral del GRV rostral o en el Complejo de Bötzing (ver Long y Duffin, 1986).

1.2.3.- Conexiones entre los grupos respiratorios bulbares

Las proyecciones axonales de las neuronas respiratorias se han investigado tanto con métodos neuroanatómicos como con métodos electrofisiológicos: transporte retrógrado de peroxidasa de rábano, transporte anterógrado de *phaseolus vulgaris*, inyección intracelular de peroxidasa o mapeo antidrómico con estimulación eléctrica. Estos métodos han demostrado las proyecciones axonales que poseen varios tipos de neuronas respiratorias bulbares. Los dos últimos métodos son especialmente útiles en la investigación de los patrones de proyección de neuronas individuales. Sin embargo, estas técnicas tienen también limitaciones. Los ensayos de mapeo antidrómico son muy útiles para demostrar las proyecciones axonales distantes, pero no permiten examinar aquellas proyecciones a zonas cercanas de la localización del soma neuronal. Por otra parte, la inyección intracelular de peroxidasa de rábano define con precisión los elementos neuronales cercanos al sitio de inyección, pero difícilmente marca aquellos más distantes al mismo. Así pues, aún no se tiene ejemplos de una visión global de las neuronas respiratorias individuales, desde su arborización dendrítica hasta sus terminales axonales más distantes. Teniendo en cuenta dichas dificultades, la información disponible hasta el momento sobre los patrones de proyección de las neuronas del Grupo Respiratorio Dorsal y de las distintas subdivisiones del GRV se muestra de forma separada para las neuronas inspiratorias y las neuronas espiratorias en la figura 10. En dicha figura sólo se presentan las proyecciones contralaterales, es decir los axones que se dirigen hacia el otro lado de la línea media; aunque hay que hacer constar

que las neuronas respiratorias bulbares también tienen proyecciones homolaterales, hacia el mismo lado de la línea media donde se encuentra situado el soma, cuya extensión varía para cada tipo neuronal dentro de una misma especie y para el mismo tipo neuronal en especies distintas (Ezure, 1990; Núñez-Abades y col., 1989a).

La descripción de las proyecciones axonales de los distintos tipos de neuronas respiratorias es la siguiente:

i) Las neuronas con patrón de disparo tipo I-A son las predominantes en el Grupo Respiratorio Dorsal. Dichas neuronas proyectan a la médula espinal y, raramente, poseen colaterales axónicas bulbares. Las neuronas tipo I-A, con proyección a la médula espinal, también son las más numerosas en el GRV rostral. Sin embargo, muchas de ellas poseen colaterales bulbares que no abandonan el GRV rostral o que se dirigen al Complejo de Bötzing.

ii) Las neuronas con patrón de disparo E-A, que envían sus axones a la médula torácica y lumbar, se encuentran agrupadas en el GRV caudal. Estas neuronas carecen de colaterales axónicas bulbares. Las neuronas tipo E-A son el subtipo más abundante en el Complejo de Bötzing, aunque poseen extensas proyecciones bulbares y sólo algunas de ellas proyectan a la médula espinal cervical.

iii) Las neuronas con patrón de descarga I-C se localizan de forma exclusiva en el GRV rostral. Estas neuronas dan lugar a numerosas colaterales que no abandonan el GRV.

iv) Las neuronas con patrón de disparo I-D y E-D están presentes en el GRV rostral y, posiblemente también, en el Complejo de Bötzing. Ambos tipos neuronales poseen extensas proyecciones bulbares, que alcanzan las distintas subdivisiones del GRV y del Grupo Respiratorio Dorsal y carecen de proyecciones axonales a la médula espinal.

(v) Numerosos tipos de motoneuronas vagales y glossofaríngeas con actividad respiratoria (inspiratoria o espiratoria) se ubican en el núcleo Ambiguo, el cual se haya inmerso en el GRV. Dichas motoneuronas inervan los músculos laríngeos y faríngeos y, en líneas generales, no poseen colaterales axónicas (Figs. 10 y 11).

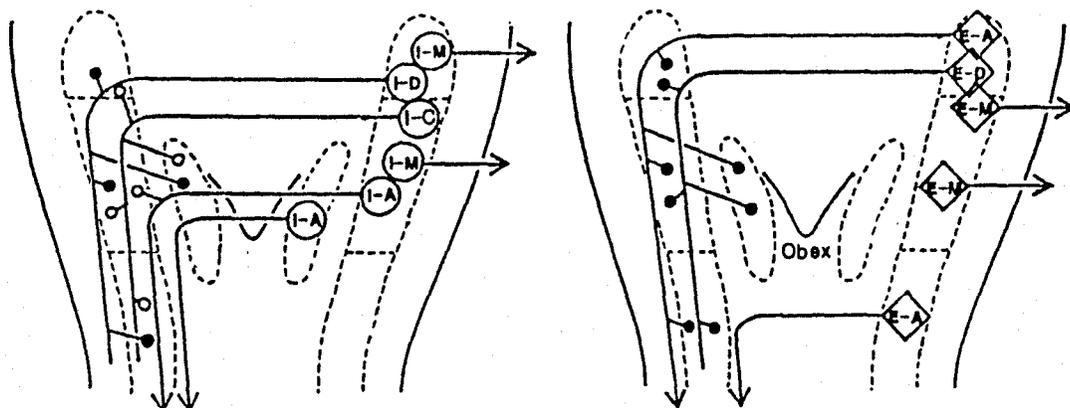


Fig. 10. Esquemas ilustrativos del bulbo raquídeo en el que se muestran los patrones de proyección axonal representativos de las neuronas inspiratorias (círculos) y espiratorias (rombos). Para simplificar sólo se muestran las proyecciones contralaterales, caracterizadas como excitatorias (círculos blancos) o inhibitorias (círculos negros). Abreviaturas: I-M y E-M, neuronas inspiratorias y espiratorias, respectivamente, cuyos axones viajan por los nervios craneales (motoneuronas); neuronas inspiratorias y espiratorias, (I-D, I-C, I-A, E-D y E-A), como en la figura 7. Las neuronas I-D y E-D sólo se han representado en el complejo de Bötzing, aunque también sean características del Grupo Respiratorio Ventral rostral. Nótese el elevado número de colaterales axónicas que presentan las neuronas propriobulbares del tipo I-C, I-D y E-D (modificado de Ezure, 1990).

Aunque se ha propuesto que existen neuronas respiratorias con propiedades marcapasos en la zona del bulbo ventrolateral (Smith y col., 1992) todos los modelos teóricos, que intentan explicar la generación del ritmo respiratorio, sugieren que el entramado neuronal del GRV podría constituir el generador de dicho ritmo.

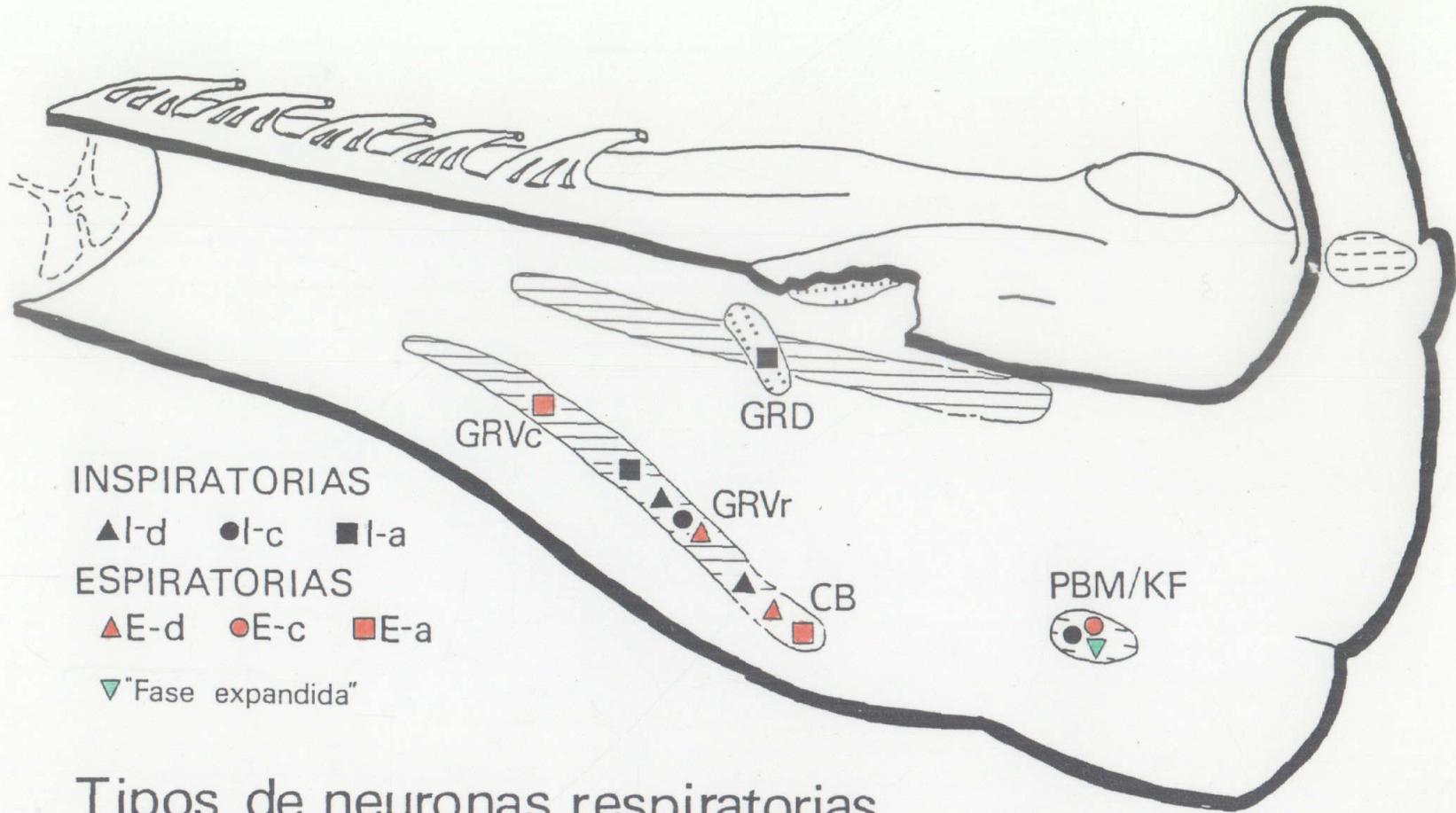
De forma concisa se puede describir la génesis del ritmo respiratorio basándose en las fases siguientes:

i) Mantenimiento de la inspiración: las neuronas I-C junto con las I-A del GRV rostral, con colaterales axónicas, forman lazos de retroalimentación positiva implicados en el mantenimiento de la inspiración y de su incremento de disparo gradual en rampa.

ii) Mantenimiento de la espiración: las neuronas E-A del Complejo de Bötzingen constituyen la fuente de inhibición de los diferentes tipos de interneuronas y motoneuronas inspiratorias durante la fase espiratoria y, de ahí, que su función sea la de mantenimiento de dicha fase.

iii) Mecanismo de paso de la fase inspiratoria a la fase espiratoria y viceversa: las neuronas I-D y E-D del GRV son dos grupos de interneuronas inhibitorias con proyecciones axonales recíprocas. Estas constituyen un oscilador neuronal que estaría implicado en las fases de transición de la fase inspiratoria a la espiratoria y viceversa.

iv) Transmisión de la información desde el generador central del ritmo respiratorio a las motoneuronas: Tanto las neuronas tipo I-A del Grupo Respiratorio Dorsal y del GRV rostral como las neuronas tipo E-A del GRV caudal son neuronas excitadoras premotoras encargadas de enviar la información desde el generador del ritmo respiratorio a las motoneuronas respiratorias, inspiratorias y espiratorias, respectivamente. (Para más información sobre modelos propuestos del generador del ritmo respiratorio ver las revisiones: Ezure, 1990; Long y Duffin 1984, 1986; Richter y col. 1986).



Tipos de neuronas respiratorias

Fig. 11. Esquema ilustrativo del bulbo y protuberancia en el que se representa la distribución de los distintos tipos de neuronas respiratorias a lo largo del mismo. Abreviaturas: como en las figuras 7 y 9.

1.2.4.- Aferencias a las áreas respiratorias centrales

Las áreas respiratorias centrales responsables de la génesis del ritmo respiratorio reciben aferencias de los receptores periféricos y de estructuras nerviosas superiores que afectan a la respiración.

1.2.4.1.- Aferencias pulmonares: receptores de adaptación lenta

En estudios pioneros realizados por Breuer y Hering (Hering, 1970) se demostró que la manipulación del volumen pulmonar puede modificar la tasa ventilatoria. Baumgarten y Kanzow (1958) mediante manipulación del volumen pulmonar pusieron de manifiesto que algunas células respiratorias localizadas en el núcleo del tracto Solitario (neuronas R β) eran interneuronas, en la vía de inhibición inspiratoria, en el reflejo de insuflación pulmonar. Se ha demostrado, así mismo, mediante el transporte anterógrado de peroxidasa de rábano inyectada en el conjunto del nervio vago o en el ganglio nodoso, que el núcleo del tracto Solitario homolateral es el sitio principal donde terminan las aferencias pulmonares (Jordan y Spyer, 1986). Más concretamente, mediante la inyección intra-axonal de aglutinina de germen de trigo agregado con peroxidasa de rábano (Kalia y Richter, 1985a y b), se hizo patente que los subnúcleos del núcleo del tracto Solitario que reciben los terminales axónicos de los receptores de adaptación lenta son: el ventral, ventrolateral, intermedial e intersticial. Por otra parte, los estudios de correlación cruzada (Averill y col., 1984) o de registro intracelular (Backman y col., 1984; Berger y Dick, 1987) han determinado que: i) los receptores de adaptación lenta excitan monosinápticamente a las neuronas inspiratorias R β del Grupo Respiratorio Dorsal; ii) no hay evidencia de que dichos terminales axónicos proyecten sobre las R α y iii) los terminales axónicos de los receptores de adaptación lenta también excitan monosinápticamente a las células P.

De estos estudios se puede concluir lo siguiente: i) puesto que las R β proyectan sobre las motoneuronas frénicas (Averill y col., 1985; Lipski y col., 1983; apartado 2.2.1), existe una vía disináptica, entre dichas aferencias y las motoneuronas frénicas,

implicada en los efectos facilitatorios de insuflación pulmonar en la actividad frénica y ii) las células P son transmisoras de la información procedente de los receptores de adaptación lenta hacia los centros respiratorios, información que juega un papel importante en el fin de la inspiración (Euler, 1983). Las neuronas que se inhiben por las células P y las vías entre las aferencias y las neuronas bulboespinales del GRV inspiratorias o espiratorias aún no han podido ser caracterizadas.

1.2.4.2.- *Aferencias pulmonares: receptores de adaptación rápida*

Experimentos electrofisiológicos mediante mapeo antidrómico (Davies y Kubin, 1986) y promediado de espigas (Kubin y Davies, 1988), y mediante técnicas anatómicas (Kalia y Richter, 1988a y b) han demostrado que las fibras procedentes de los receptores de adaptación rápida proyectan a los subnúcleos caudal, medial, comisural, dorsal, dorsolateral e intermedial del núcleo del tracto Solitario. Estos resultados indican que: i) los terminales de los receptores de adaptación rápida difieren considerablemente de los de adaptación lenta y ii) ninguno de los terminales axonales están asociados con el Grupo Respiratorio Dorsal. Las neuronas en las que los receptores de adaptación rápida terminan y su relación con las neuronas respiratorias son, hoy por hoy, desconocidas.

1.2.4.3.- *Aferencias cardiovasculares*

Las proyecciones centrales de los aferentes sensoriales cardiovasculares se han estudiado mediante inyección de peroxidasa de rábano en el nervio del seno carotídeo (Jordan y Spyer, 1986). Estos experimentos demostraron que el subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario no posee terminales axónicos procedentes de este nervio. En estudios de mapeo antidrómico se mostró que los barorreceptores (de la aorta y del seno carotídeo) proyectan principalmente a los subnúcleos dorsomedial y dorsolateral del núcleo del tracto Solitario (Donoghue y col., 1982a, 1984). Los efectos de la activación de los barorreceptores sobre las neuronas espiratorias o inspiratorias del GRV se investigaron mediante

registro intracelular (Richter y Sellar, 1975); resultando que las neuronas inspiratorias se hiperpolarizaron, mientras que las neuronas espiratorias se despolarizaron.

Las proyecciones centrales de los quimiorreceptores se determinaron usando la técnica de mapeo antidrómico (Donoghue y col., 1984). Los terminales axónicos se localizaron en los subnúcleos medial y dorsomedial del núcleo del tracto Solitario, fuera del ámbito del Grupo Respiratorio Dorsal. Estos terminales evocan también una actividad postsináptica (despolarización o hiperpolarización) en las neuronas del núcleo del tracto Solitario. Así pues, teniendo en cuenta las discrepancias habidas entre la ubicación de los terminales axónicos y las neuronas respiratorias, es probable que dichas entradas se procesen mediante interneuronas.

1.2.4.4.- *Aferencias laríngeas*

Trás la inyección de peroxidasa de rábano en el nervio laríngeo superior (Altschuler y col., 1989; Hanamori y Smith, 1986; Kalia y Mesulam, 1980) se encontraron terminales axónicos en los subnúcleos intersticial, central y dorsal del núcleo del tracto Solitario. La estimulación eléctrica del nervio laríngeo superior (Berger, 1977; Donnelly y col., 1989) da lugar a una excitación de latencia corta en las neuronas inspiratorias del Grupo Respiratorio Dorsal; sugiriendo, por tanto, la existencia de un circuito que implica a estas aferencias, al Grupo Respiratorio Dorsal y a las motoneuronas frénicas. Además, las aferencias laríngeas influyen decisivamente sobre la resistencia de la misma (González-Barón y col., 1978a y b; 1981; 1989).

1.2.4.5.- *Aferencias frénicas*

En animales con respiración espontánea, los órganos tendinosos y los pocos husos musculares que están presentes en el diafragma descargan en fase con la actividad respiratoria (Corda y col., 1965; Duron y Jung-Caillol, 1973). Sin embargo, la

interrupción de estas aferencias (Sant'Ambrogio y col., 1962) no produce efectos en la actividad del nervio frénico, lo que hace pensar que las aferencias diafragmáticas propioceptivas no tienen una influencia significativa sobre los centros respiratorios.

1.2.4.6.- *Aferencias intercostales*

Estudios recientes (Bolser y col., 1987; Shannon y Lindsey, 1987; Shannon y col., 1987) han mostrado que: i) tanto los órganos tendinosos de los músculos intercostales internos como los de los intercostales externos tienen un efecto inhibitorio sobre las neuronas inspiratorias bulbares y bulboespinales espiratorias, y ii) la estimulación de los órganos tendinosos intercostales provocan una disminución en la actividad de las neuronas espiratorias del Complejo de Bötzing. No obstante, se desconocen las vías espinales y centrales por las que las aferencias propioceptivas intercostales afectan a los centros respiratorios.

1.2.4.7.- *Aferencias abdominales*

Los efectos respiratorios inducidos por la estimulación de las aferencias procedentes de los nervios abdominales espiratorios o de los intercostales espiratorios son básicamente los mismos. Por ejemplo, cuando el nervio intercostal lateral, que inerva el músculo oblicuo abdominal, se estimula las neuronas del Grupo Respiratorio Dorsal ($R\alpha$ y $R\beta$ pero no las células P) y las neuronas del GRV se inhiben (Shannon, 1980).

1.2.4.8.- *Aferencias desde otras estructuras centrales*

El sistema respiratorio, además de estar implicado en el aporte de oxígeno al organismo y participar en la homeostasia de los líquidos corporales, tiene un papel comportamental. Así pues, determinados centros neuronales pueden influir sobre la actividad respiratoria durante los procesos de termorregulación, sueño o control voluntario de la respiración. Se ha descrito que la estimulación eléctrica de la corteza cerebral provoca respuestas en

la actividad del nervio frénico (Colle y Massion, 1958), o que cambios en los estados de vigilia producen cambios en el patrón respiratorio (Orem y col., 1977; Remmers y col., 1976). La respiración es más regular y con mayor duración de la inspiración durante el sueño profundo que durante el sueño paradójico o en estados de vigilia. También se ha descrito que la hipertermia da lugar a un gran incremento en la frecuencia respiratoria; y que durante el vómito los músculos respiratorios pierden su función respiratoria pasando a estar dominados por unos centros, aún teóricos, denominados centros del vómito (Bianchi y Grélot, 1989).

Por lo tanto, como resumen, se puede afirmar que la actividad de las motoneuronas respiratorias depende de numerosas entradas diferentes; o lo que es lo mismo, éstas reciben múltiples mensajes (como de los receptores periféricos o de otros centros neuronales superiores) que interactúan con la información que les llega de los centros generadores del ritmo respiratorio. La integración de todos estos mensajes tiende a ajustar el patrón respiratorio a las distintas circunstancias y necesidades del organismo (ver revisión de Monteau y Hilaire, 1991)

1.2.5.- Características especiales de los centros respiratorios en la rata

Aunque la rata ha sido muy usada para todo tipo de estudios electrofisiológicos (Paxinos, 1985), la organización de los centros respiratorios de la rata ha recibido muy poca atención en comparación con la dada al gato. De ahí que haya muy pocas publicaciones sobre el tema en la actualidad (Bystryzcka y Nail, 1985; Howard y Tabatai, 1975; Ondina y col., 1960). Sin embargo, la rata se ha usado en estudios neurofarmacológicos para determinar los neurotransmisores implicados en la regulación respiratoria (Hedner, 1983; Lagercrantz, 1984).

Puesto que: i) la extrapolación a la organización neurofisiológica respiratoria del gato de los resultados de los estudios neurofarmacológicos realizados en la rata parece ser dudosa (Onai y col., 1987a); ii) las preparaciones *in vitro* de tronco del encéfalo-médula espinal de ratas recién nacidas (Suzue,

1984) o de rodajas de tronco de encéfalo (Núñez-Abades y col., 1991b y 1992b) parecen tener un potencial tremendo para el estudio de diversos aspectos de la ritmogénesis respiratoria; iii) hay un creciente rechazo social al uso de animales domésticos (i.e.: el gato) en el laboratorio y iv) la rata como modelo experimental es mucho más económico y de más fácil adquisición, debido a la proliferación de granjas especializadas; los centros respiratorios de la rata han recibido una atención creciente en los últimos cinco años. El primero de estos estudios (Saether y col., 1987) condujo a la conclusión de que la localización de las neuronas respiratorias en la rata se corresponde con la descrita en el bulbo del gato, así se determinó el Grupo Respiratorio Dorsal y el GRV. Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado la presencia de un Grupo Respiratorio Dorsal en la rata, por lo que es aún hoy materia de debate. Experimentos realizados mediante registro extracelular (Ezure y col., 1988) o intracelular (Zheng y col., 1991a) fallaron en confirmar la existencia de neuronas inspiratorias en el bulbo dorsal. Así mismo, las proyecciones eferentes de las neuronas respiratorias bulbares se estudiaron usando el marcaje neuronal retrógrado (Onai y col., 1987b) y anterógrado (Yamada y col., 1988). Los resultados fueron que: pocas neuronas se marcaron retrógradamente tras la inyección de peroxidasa de rábano en el núcleo frénico y pocos terminales axónicos se encontraron en el núcleo frénico tras la inyección de *phaseolus vulgaris*-leucoaglutinina en el núcleo del tracto Solitario. Estos resultados rechazan la ubicación de un Grupo Respiratorio Dorsal en la rata. Experimentos de lesión realizados en preparaciones *in vitro* en ratas recién nacidas sugieren la misma conclusión; sólo se observaron cambios moderados en la respiración al eliminar la mitad dorsal del bulbo (Arata y col., 1990) y al realizar grandes lesiones electrolíticas en el núcleo del tracto Solitario (Hilaire y col., 1990). Así pues, la validez de los centros respiratorios del gato como único modelo para la ritmogénesis respiratoria tendría que modificarse si experimentos futuros prueban que esta conclusión es cierta. No obstante, estudios recientes (Bonham y McCrimmon, 1990) sugieren que algunas neuronas inspiratorias pueden existir en la zona ventrolateral del núcleo del tracto Solitario, pero no con la importancia que este grupo tiene en el gato.

Con la excepción del Grupo Respiratorio Dorsal, que requiere un examen más detallado, parece ser que la organización del GRV es similar en el gato y la rata. La mayoría de los datos electrofisiológicos o neuroanatómicos obtenidos en la rata son consistentes con los datos previos en el gato. Localización, patrones de descarga, morfología y propiedades intrínsecas de las neuronas (Ezure y col., 1988; Saether y col., 1987; Zheng y col., 1991a), conexiones con otras estructuras troncoencefálicas (Ellenberger y Feldman, 1990a) o espinales (Ellenberger y Feldman, 1988; Onai y col., 1987a y b; Saether y col., 1987; Yamada y col., 1988) son casi idénticas entre ambas especies. Sin embargo, una diferencia interesante existe respecto de las neuronas bulboespinales espiratorias del GRV caudal: en el gato estas neuronas son neuronas premotoras, carentes de colaterales axónicas bulbares (ver fig. 3); mientras que en la rata, las neuronas bulboespinales espiratorias del GRV caudal muestran un número elevado de colaterales intrabulbares, que podrían estar implicadas en el entramado bulbar de las neuronas generadoras del patrón respiratorio.

2.- PLANTEAMIENTO GENERAL Y OBJETIVOS

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios para establecer el mecanismo por el cual el sistema nervioso central codifica la respuesta motora, que posibilita los movimientos respiratorios, e integra la información de los receptores periféricos y de otras estructuras centrales, lo que permite adaptar el sistema generador del patrón respiratorio a las condiciones internas y externas del organismo. En ellos se ha puesto de manifiesto que una zona concreta del bulbo ventrolateral (GRV) posee una enorme variedad de tipos neuronales. Estas neuronas, además de poseer un patrón de descarga en consonancia con la respiración, son firmes candidatas para ser las responsables de la génesis del ritmo respiratorio. El GRV incluye motoneuronas, neuronas bulboespinales y neuronas propriobulbares respiratorias. Las motoneuronas del GRV se incluyen dentro del núcleo Ambiguo, núcleo anatómico que posee una enorme complejidad estructural, donde se localizan las motoneuronas laríngeas (de los nervios laríngeo recurrente y laríngeo superior), faríngeas (de las ramas faríngeas de los nervios vago y glossofaríngeo), y esofágicas y las neuronas preganglionares parasimpáticas (que inervan el corazón y otras estructuras supradiafragmáticas).

El presente trabajo de investigación pretende establecer un mejor conocimiento de la organización neuronal del GRV en la rata. Esta información es hoy necesaria para los estudios neurofarmacológicos y electrofisiológicos (tanto en preparaciones *in vivo* como *in vitro*) que se realicen en la rata, como modelo experimental alternativo al gato.

Para ello, se han cubierto los siguientes objetivos experimentales:

i) Identificación de los distintos tipos neuronales que constituyen el núcleo Ambiguo.

ii) Identificación de los distintos tipos neuronales del Grupo Respiratorio Ventral.

iii) Caracterización de las aferencias (simples y bilaterales) a las principales subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral.

iv) Caracterización de las eferencias (simples y bilaterales) del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical.

3.- MATERIAL Y METODOS

Para responder a los objetivos propuestos los experimentos se dividieron en seis grupos:

i) Caracterización y organización topográfica de las distintas neuronas craneales del núcleo ambiguo mediante la utilización simultánea de cuatro marcadores neuronales fluorescentes por transporte axónico retrogrado: azul rápido (Kuypers y col., 1980), amarillo diamidino (Keizer y col., 1983), fluoro oro (Schmued y Fallon, 1986) y rodamina-B-isotiocianato (Thanos y Bonhoeffer, 1983).

ii) Caracterización de la organización del Grupo Respiratorio Ventral mediante la utilización simultánea de tres marcadores fluorescentes: azul rápido, amarillo diamidino y fluoro oro.

iii) Caracterización de las proyecciones aferentes simples a los tres subgrupos del Grupo Respiratorio Ventral, empleando el marcador fluorescente azul rápido.

iv) Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales a los tres subgrupos del Grupo Respiratorio Ventral mediante la utilización simultánea de azul verdadero (Bentivoglio y col., 1980) y amarillo diamidino.

v) Caracterización de las proyecciones eferentes simples del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical, usando el marcador fluorescente azul rápido.

vi) Caracterización de las proyecciones eferentes bilaterales del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical, mediante la utilización de los tres marcadores fluorescentes; azul rápido, amarillo diamidino y fluoro oro.

3.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Los experimentos incluidos en la presente Tesis Doctoral se realizaron en rata albina de la especie Wistar (*Rattus norvegicus*) con pesos comprendidos entre 200 y 400 g. El total de animales utilizados fue diferente en cada uno de los seis apartados propuestos, según la amplitud de los objetivos y las dificultades experimentales de los mismos.

3.2.- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

Veinticuatro horas antes de la operación, el animal se sometió a un ayuno de sólidos, con objeto de evitar complicaciones debidas a la anestesia. Así mismo, el material quirúrgico se sumergió, durante el mismo período de tiempo, en una solución de Armil al 0.1% para lograr unas condiciones de asepsia adecuada.

El día de la operación los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (50 mg/Kg), diazepam (2,5 mg/Kg) y sulfato de atropina (0,5 mg/Kg). Este último se administró para evitar una intensa secreción mucosa en las vías respiratorias altas. En los experimentos en los que se intervino en la médula espinal al animal, se usó como anestésico una solución al 7% de hidrato de cloral (40 mg/Kg, i. p.) en agua destilada, para prolongar el período de anestesia. En todos los casos se administraron dosis de mantenimiento del anestésico, vía intramuscular, cuando los animales presentaron reflejos corneales o reflejos de flexión de las extremidades. La temperatura del animal se mantuvo dentro del margen fisiológico (38° aproximadamente), con la ayuda de una manta térmica controlada por un termómetro rectal.

3.2.1.- Caracterización de las neuronas craneales del núcleo Ambiguo.

Estos experimentos se llevaron a cabo en 27 animales. Bajo anestesia profunda, el animal se colocó en posición decúbito prono y se le realizó una incisión en el cuello. Los músculos y nervios del lado derecho, que se citan a continuación, se disecaron convenientemente mediante la retirada de la conjuntiva que los envuelve:

i) músculo estilofaríngeo y nervio glossofaríngeo que lo inerva (Figs. 4 y 12);

ii) músculos constrictores faríngeos y ramas faríngeas del nervio vago que los inervan (Figs. 4 y 12);

iii) músculo cricotiroideo y nervio laríngeo superior que lo inerva (Fig. 6);

iv) nervio laríngeo recurrente que inerva los músculos intrínsecos laríngeos siguientes: cricoaritenideo posterior, tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral (Fig. 6); y

v) borde distal del tronco cervical del nervio vago, que inerva los músculos intrínsecos de la laringe a través del nervio laríngeo recurrente, el esófago y otras estructuras supradiafragmáticas (Fig. 12).

A continuación, se introdujo un hilo de seda por debajo de los músculos y/o nervios, de tal forma que quedaron aislados del resto de las estructuras próximas los mismos.

Los fluorocromos se inyectaron bajo un microscopio de disección quirúrgica (Zeiss) con micropipetas de vidrio (puntas 100-200 μm de diámetro) conectadas a un dispositivo de inyección por presión (pico-spritzer; General Valve). Para la inyección en los músculos, la micropipeta se introdujo reiteradas veces en la masa muscular hasta que ésta se coloreó por el trazador. Para las inyecciones en los nervios, la punta de la micropipeta se insertó en el nervio aislado a través del perineurio, tras lo cual se

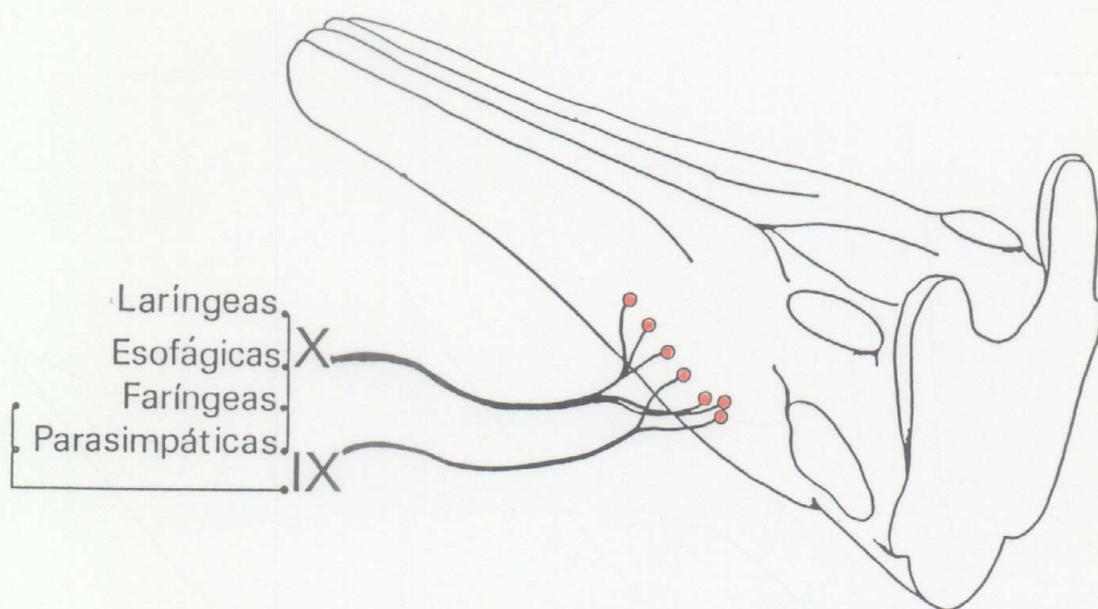


Fig. 12. Esquema ilustrativo del tronco del encéfalo en el que se representan los distintos tipos de motoneuronas y neuronas parasimpáticas que constituyen el núcleo ambiguo: motoneuronas laríngeas de los nervios laríngeo recurrenente y laríngeo superior; motoneuronas esofágicas; motoneuronas faríngeas, de las ramas faríngeas del vago (X) y rama faríngea del glossofaríngeo (IX) y neuronas parasimpáticas del X y del IX.

procedió a depositar en él pequeñas cantidades del fluorocromo (del orden de nanolitros).

Para conocer la localización precisa, dentro del núcleo Ambiguo, de las motoneuronas que inervan los diferentes músculos o nervios, se inyectó una solución de fluoro oro al 2% (Fluorochrome) o de azul rápido al 2% (Dr. Illing) en salino al 0.9% en 3 animales para cada uno de los experimentos siguientes:

i) músculo estilofaríngeo y/o nervio glossofaríngeo; ii) ramas faríngeas del nervio vago y/o músculos constrictores faríngeos; iii) músculo cricotiroideo; iv) nervio laríngeo recurrente; y, v) nervio vago (Fig. 12);

Para determinar la localización relativa de unas poblaciones neuronales respecto de otras se siguieron los dos protocolos experimentales siguientes:

i) En 6 animales se inyectó de 0,1 a 0,2 μ l de una solución de amarillo diamidino al 2% (Dr. Illing) en salino al 0.9% en el nervio laríngeo recurrente; de 0,1 a 0,2 μ l de una solución de rodamina-B-isotiocianato al 10% (Sigma) en salino al 0.9% en el extremo distal del tronco cervical del nervio vago; de 0,4 a 0,6 μ l de una solución de azul rápido en el músculo cricotiroideo y de 0,6 a 0,8 μ l de una solución de fluoro oro en los músculos constrictores faríngeos medial y caudal, músculo estilofaríngeo y nervio glossofaríngeo; y ii) en 6 animales se inyectó de 0,4 a 0,6 μ l de una solución de amarillo diamidino en el músculo cricotiroideo; de 0,6 a 0,8 μ l de una solución de azul rápido en los músculos constrictores faríngeos y de 0,1 a 0,2 μ l de una solución de fluoro oro en el nervio vago.

3.2.2.- Caracterización de la organización topográfica del Grupo Respiratorio Ventral

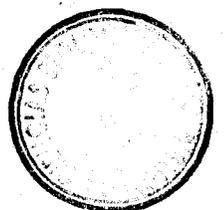
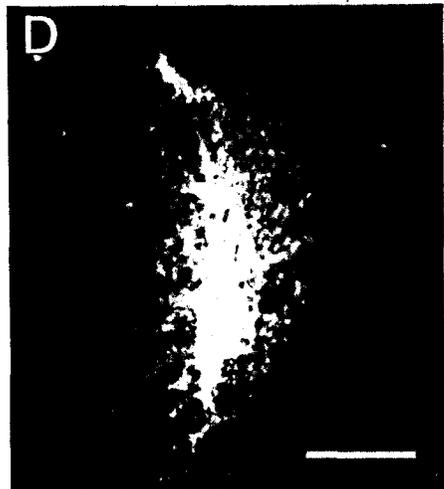
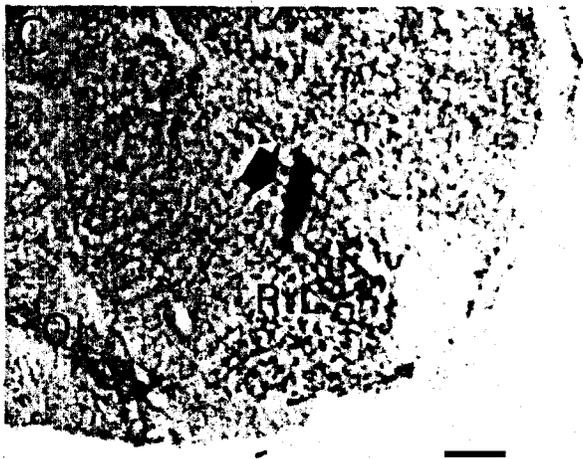
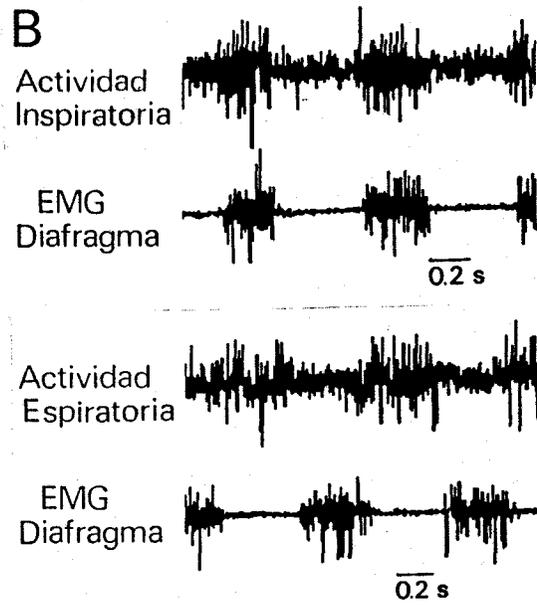
El protocolo experimental necesitó de 15 animales en su totalidad. Con esta serie experimental se pretendió estudiar la

localización relativa de las neuronas propiobulbares y bulboespinales respecto de las motoneuronas del núcleo Ambiguo dentro del GRV.

Para marcar las motoneuronas del núcleo Ambiguo, y siguiendo la metodología del apartado anterior para la disección de nervios y músculos e inyección del fluorocromo, los músculos y nervios siguientes se inyectaron bilateralmente: músculos constrictores faríngeos caudal y medial, músculo cricotiroideo, nervio vago cervical y músculo estilofaríngeo. Las micropipetas (con puntas de 100 a 200 μm de diámetro) se llenaron con una solución de fluoro oro al 2% en salino y se depositó un volumen de 0,1 a 0,2 μl en los nervios y 0,4 a 0,8 μl en los músculos.

Tres días más tarde, los animales se anestesiaron de nuevo por el procedimiento previamente descrito. En ellos se monitorizó la actividad respiratoria central por medio de dos electrodos de registro (hilos de plata aislados, de 200 μm de diámetro) insertados en el diafragma del lado abdominal. La señal obtenida por este registro se amplificó y se mostró en un osciloscopio digital (Hameg, 205 HM-2). Posteriormente, el animal se colocó en un aparato estereotáxico (Narishige), sujetándole la cabeza con dos barras colocadas en ambos orificios óticos externos y con un bocado nasal. Así mismo, el animal se inmovilizó mediante la sujeción de los procesos espinosos de la vértebra torácica T2 con una pinza plana conectada al aparato estereotáxico. Para poder localizar las neuronas bulboespinales del GRV que proyectan al núcleo frénico, se registró la actividad de las motoneuronas frénicas mediante una micropipeta de vidrio insertada en la médula espinal cervical derecha, a nivel de C4, tras una laminectomía dorsal de la vértebra de dicha zona. La micropipeta (con puntas de 75 a 150 μm de diámetro; 1-2 $\text{M}\Omega$ de impedancia) se llenaron con una mezcla a partes iguales de dos soluciones: i) cloruro sódico al 2% en agua destilada y ii) azul rápido al 2% en etanol de 96°. La inyección se realizó mediante pulsos de presión aplicados a la misma micropipeta (Fig. 13A) con la que se registró la actividad inspiratoria (Fig. 13B).

Fig. 13. A: Microfotografía bajo microscopía de fluorescencia de una sección coronal a nivel de la médula espinal cervical (C4) mostrando la localización de la inyección de azul rápido (flecha) en el núcleo frénico. Barra: 200 μ . B: Registro electrofisiológico: arriba, actividad multiunitaria inspiratoria de las motoneuronas frénicas de la médula espinal cervical; abajo, actividad multiunitaria espiratoria de las neuronas del GRV caudal en el bulbo. C: Microfotografía de una sección coronal del bulbo mostrando la localización de la inyección de amarillo diamidino (flecha) en el GRV caudal registrado en B. Barra: 200 μ . D: Microfotografía de mayor aumento del sitio de inyección mostrado en C bajo microscopía de fluorescencia. Barra: 50 μ . Abreviaturas: OI, núcleo de la oliva inferior; RtL, núcleo reticular lateral; EMG, electromiograma del músculo diafragma.



Para identificar las neuronas propiobulbares en el GRV que proyectan a las neuronas espiratorias del GRV caudal, en primer lugar se flexionó 25° la cabeza del animal en dirección ventral al plano horizontal del atlas de Paxinos y Watson (1986) y se inmovilizó con el bocado del aparato estereotáxico. A continuación, se le practicó una craneotomía occipital para acceder con facilidad a las superficie del bulbo raquídeo. La micropipeta, con las mismas características de las descritas anteriormente para la inyección en la médula espinal, se llenó con una mezcla a partes iguales de dos soluciones: i) solución de cloruro sódico al 2% en agua destilada y ii) solución de amarillo diamidino al 2% en etanol de 96°. Esta micropipeta se insertó, en el bulbo caudal, en las coordenadas apropiadas (descritas en el apartado 3.2.3) hasta encontrar actividad espiratoria espontánea (Fig. 13B). La inyección de amarillo diamidino se realizó aplicando pulsos de presión sobre la misma micropipeta en el sitio donde se registro actividad espiratoria (Fig. 13 C y D).

3.2.3.- Caracterización de las proyecciones aferentes a las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral

Esta serie experimental se llevó a cabo en 15 animales. Se pretendió localizar las neuronas que proyectan específicamente a las diferentes subdivisiones del GRV de la rata. Los animales, una vez anestesiados, se mantuvieron con respiración espontánea. La monitorización de la actividad respiratoria del músculo frénico, fijación del animal en el estereotáxico y exposición del bulbo raquídeo se llevó a cabo como en el apartado 3.2.2.

En primer lugar se localizó el sitio de inyección deseado en cada uno de los experimentos: complejo de Böttinger, GRV rostral y GRV caudal. Las micropipetas de vidrio (con puntas de 75 a 150 μm de diámetro, 1 a 2 M Ω de impedancia), rellenas con una solución de azul rápido (apartado 3.2.2.), se insertaron en el bulbo en las coordenadas apropiadas. Puesto que el núcleo Ambiguo se encuentra inmerso en el GRV, se tomó en todo momento como referencia anatómica para la ubicación inicial de la micropipeta, la

profundidad y la lateralidad de dicho núcleo de acuerdo con las coordenadas indicadas en el atlas de Paxinos y Watson, (1986) (1,9 mm de lateralidad y 3 mm de profundidad).

Para la identificación rápida de la subunidad del GRV buscada, la micropipeta se colocó inicialmente a nivel del óbex y se movió en dirección caudal unos 0,5 mm cuando se buscó el GRV caudal ó 1 mm rostral cuando se escogió el Complejo de Bötzinger como lugar de inyección. En el caso del GRV rostral el rastreo se inició a nivel del óbex (Fig. 14).

Las inyecciones se realizaron mediante pulsos de presión aplicados en la misma micropipeta (Fig. 15A, C y E) en aquellas zonas del bulbo ventrolateral donde se registró previamente actividad extracelular multiunitaria inspiratoria o espiratoria (Fig. 15B, D y F) durante, al menos, 150 μ m en el eje dorso-ventral. Esta precaución aseguró que la pipeta estuvo situada en la zona de máxima concentración de neuronas respiratorias (en el eje dorso-ventral), o lo que es lo mismo, que la pipeta se encontró realmente en el GRV y no estuvo registrando alguna neurona respiratoria aislada de la formación reticular bulbar. Los volúmenes inyectados variaron entre 50 y 100 nl.

3.2.4.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales a las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral

En este apartado se utilizaron 30 animales experimentales. Una vez conocidos los grupos neuronales que envían proyecciones simples al GRV, se pretendió caracterizar cual de ellos envía proyecciones axonales bilaterales mediante colaterales axónicas a ambos lados (izquierdo y derecho respecto de la línea media) de la misma subdivisión del GRV. Estas neuronas, si existieran, podrían estar implicadas en la sincronización de la actividad del GRV, izquierdo y derecho.

Para cumplimentar este objetivo, 10 animales se inyectaron en el GRV caudal izquierdo con una mezcla, a partes iguales, de dos

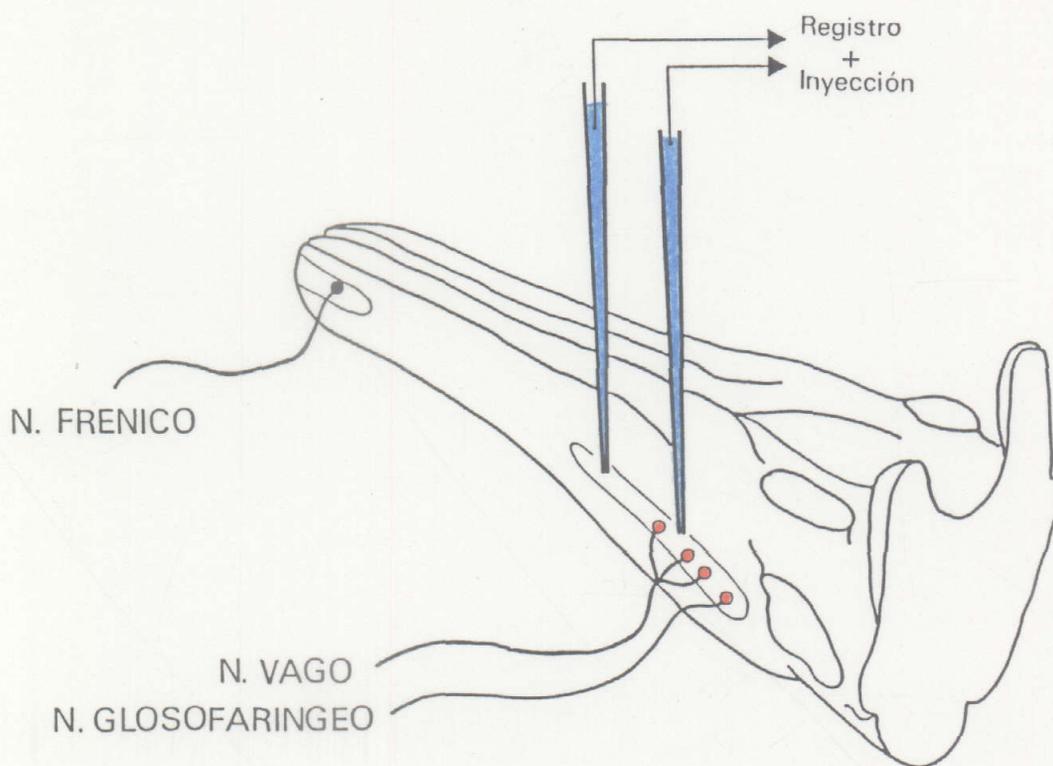
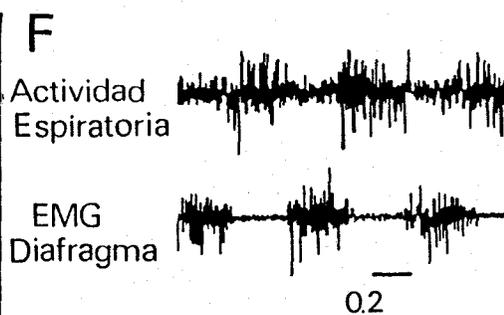
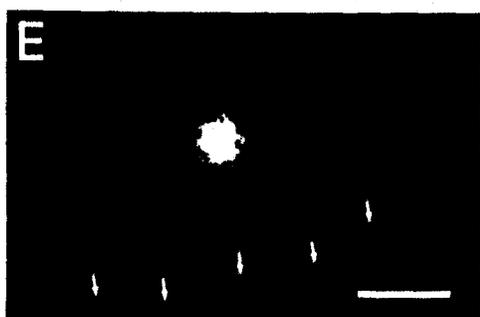
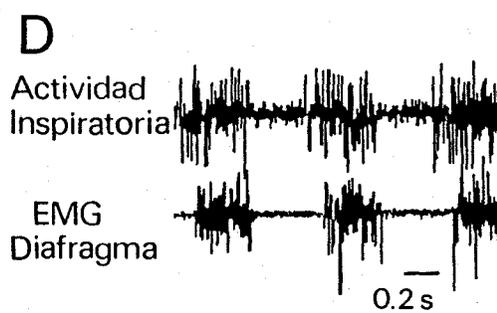
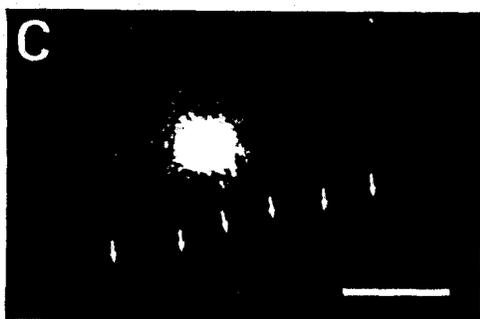
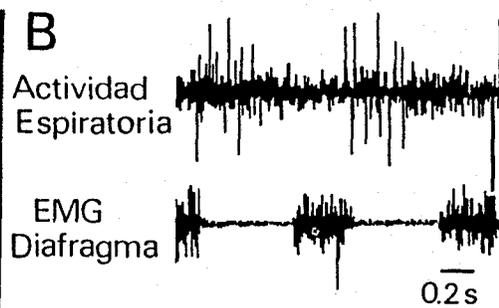
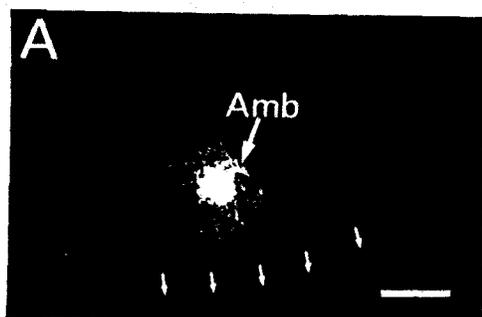


Fig. 14. Esquema ilustrativo del bulbo y protuberancia en el que se representan dos de los tres tipos de inyecciones realizados con el marcador fluorescente azul rápido en las áreas del bulbo ventrolateral donde se registró actividad respiratoria, bien inspiratoria (derecha) o bien espiratoria (izquierda). Los registros se hicieron con la misma micropipeta que se utilizó para la inyección del fluorocromo por presión. Abreviaturas como en la figura 13.

Fig. 15. A, C y E: Microfotografías de tres secciones coronales del bulbo de la rata donde se muestra la localización de las inyecciones de azul rápido en los tres subgrupos del Grupo Respiratorio Ventral (GRV). A: Complejo de Böttinger (CB), la flecha indica la formación compacta del núcleo ambiguo. C: GRV rostral. E: GRV caudal. Barras: 500 μ . En la parte superior de B, D y F se muestra la actividad multiunitaria registrada extracelularmente en los distintos subgrupos del GRV y en la parte inferior las fases respiratorias del electromiograma del músculo diafragma. B: actividad multiunitaria espiratoria registrada en el CB. D: Actividad multiunitaria inspiratoria registrada en el GRV rostral. F: Actividad multiunitaria espiratoria registrada en el GRV caudal.



soluciones: i) cloruro sódico al 2% en agua destilada y ii) azul verdadero al 2% (Dr. Illing) en etanol de 96°. Posteriormente, en el GRV caudal derecho de los mismos animales se inyectó una solución de amarillo diamidino (apartado 3.2.2.).

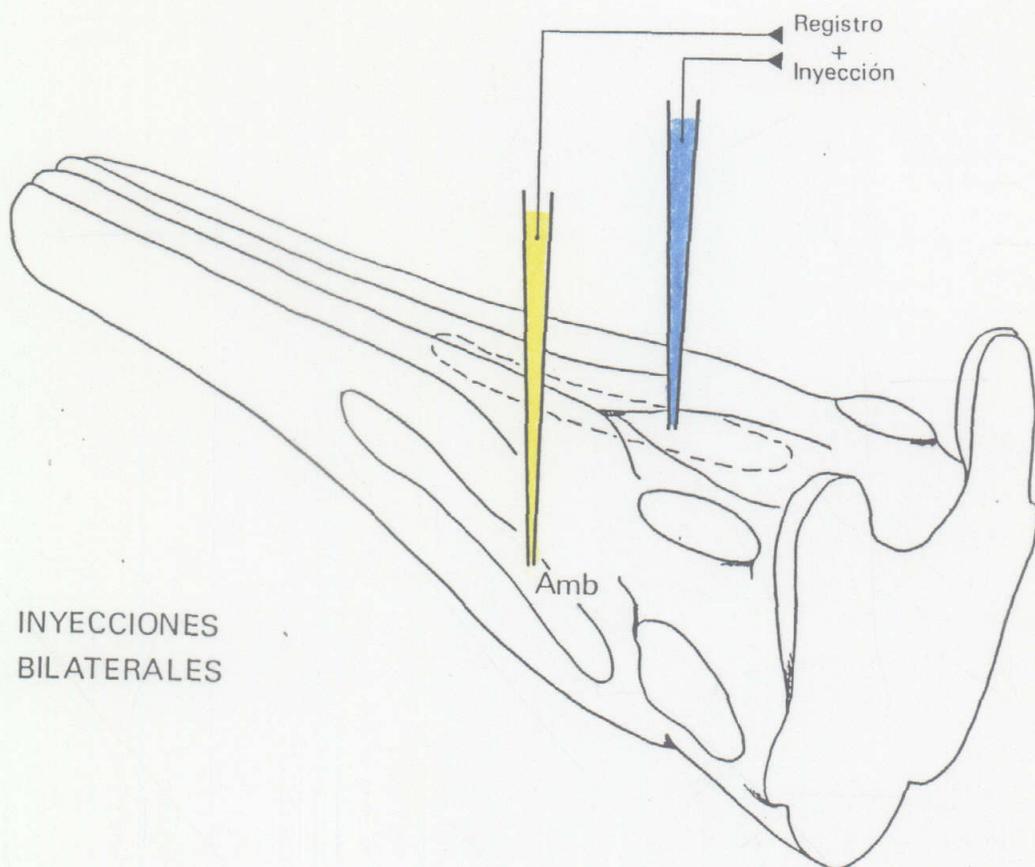
Al igual de lo realizado para inyectar el GRV caudal a ambos lados de la línea media, se utilizaron 10 animales para la inyección bilateral de azul verdadero y amarillo diamidino en el GRV rostral (Figs. 16 y 17) y otros 10 animales se inyectaron bilateralmente, con los fluorocromos citados, en el Complejo de Bötzinger.

La metodología seguida para la monitorización de la actividad respiratoria del músculo frénico, fijación del animal en el estereotáxico y exposición del bulbo raquídeo fue la misma que la descrita en el apartado 3.2.2. La localización de los distintos subgrupos del GRV e inyección de los fluorocromos fue realizada de forma semejante a la descrita en el apartado 3.2.3 (Fig. 16).

3.2.5.- Caracterización de las proyecciones eferentes del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical

Esta serie experimental se llevó a cabo en 16 ratas. El objetivo experimental consistió en localizar exactamente, dentro de las distintas subdivisiones del GRV, aquellas neuronas que envían proyecciones simples al núcleo frénico y la importancia cuantitativa de dichas proyecciones frente a otras fuentes de entradas del núcleo frénico.

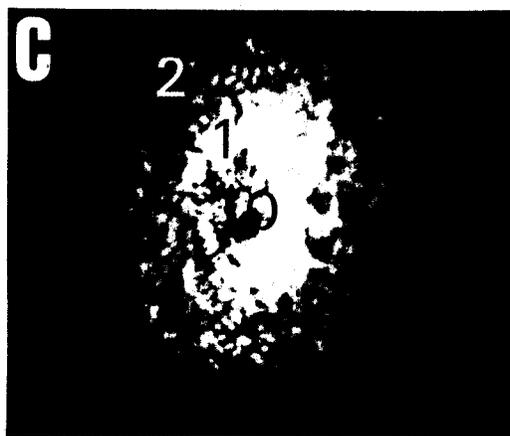
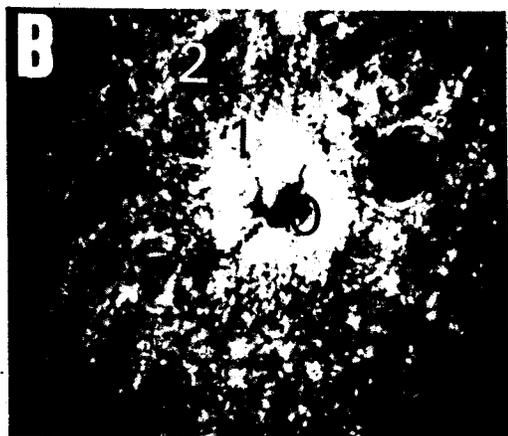
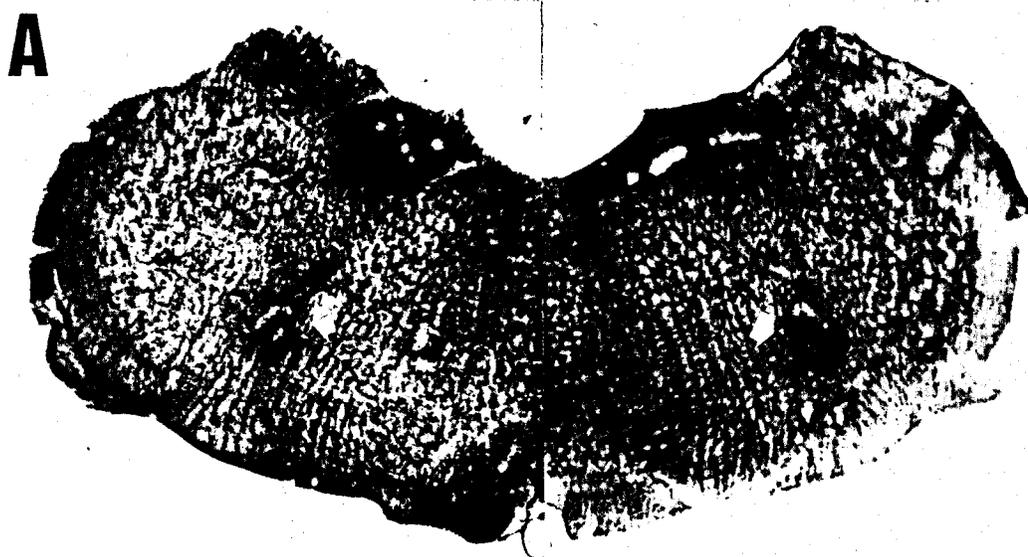
Para la consecución de dicho objetivo, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2. Sin embargo, la monitorización de la respiración se llevó a cabo midiendo los cambios en la concentración de CO₂ en el aire respirado, utilizando para ello un analizador de gases. Esta técnica, a diferencia de la electromiografía del diafragma, no requiere cirugía adicional ya que se trata de una técnica no invasiva. Dicha señal se amplificó y



INYECCIONES
BILATERALES

Fig. 16. Esquema ilustrativo del bulbo y protuberancia en el que se representa la inyección bilateral de marcadores fluorescentes azul rápido (azul) y amarillo diamidino (amarillo), previo registro de la actividad respiratoria, en el GRV rostral.

Fig. 17. A: Microfotografía de una sección coronal del bulbo mostrando los sitios de inyección de azul verdadero en la izquierda y de amarillo diamidino en la derecha en el GRV rostral. B-C: Microfotografías bajo microscopia de fluorescencia, a mayor aumento, de los sitios de inyección (flechas en A). En ellas se indican las tres zonas concéntricas (0, 1, 2) del área de difusión característica de cada marcador fluorescente utilizado. Nótese que el área de difusión de la inyección de azul verdadero fue de mayor tamaño.



mostró en un osciloscopio (Hameg, 205 HM) al mismo tiempo que el registro extracelular multiunitario de las motoneuronas frénicas (Fig. 18A y B).

Tras la realización de una laminectomía dorsal en la vértebra C4 se insertó una micropipeta de vidrio de 25 a 40 μm de diámetro en la punta (de 6 a 8 $\text{M}\Omega$ de impedancia) en la médula espinal cervical del lado derecho, siguiendo las coordenadas de lateralidad y profundidad del núcleo frénico (1,1 mm lateral y 2 mm de profundidad, atlas de Paxinos y Watson, 1986). Previamente las micropipetas se llenaron con una solución de azul rápido o amarillo diamidino, a las concentraciones indicadas en el apartado 3.2.2.

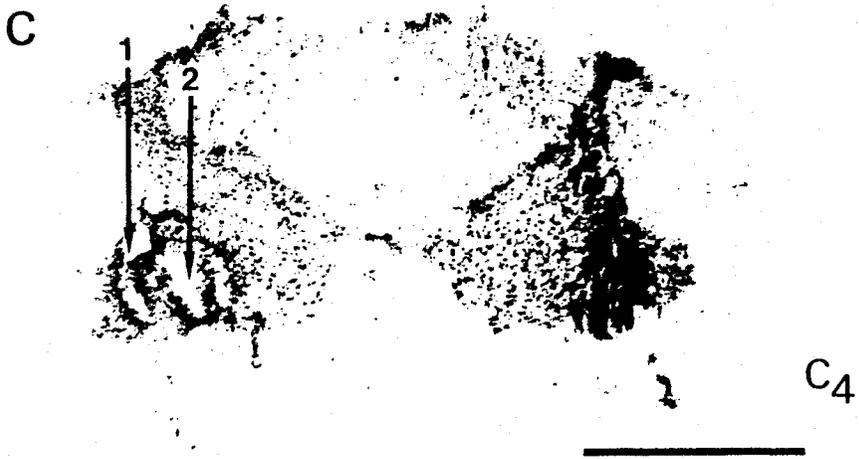
Para evitar que la inyección del fluorocromo se saliera fuera de los límites del núcleo frénico (Fig. 18C) se tomaron dos precauciones: i) se inyectó allí donde se registró actividad extracelular inspiratoria durante, al menos, 100 μm en el eje dorsoventral; y ii) se evitó el riesgo de registro de axones de paso, procedentes de las neuronas bulboespinales inspiratorias que viajan a través de la sustancia blanca ventral hacia posiciones más caudales de la médula espinal, no realizando incursiones de más de 2,2 mm de profundidad en la médula espinal.

3.2.6.- Caracterización de las proyecciones eferentes bilaterales del Grupo Respiratorio Ventral a la médula espinal cervical.

Los experimentos siguientes se llevaron a cabo en 16 animales. Una vez conocida la localización de las neuronas que envían proyecciones axonales simples al núcleo frénico, se pretendió caracterizar la existencia de neuronas que envían proyecciones mediante colaterales axónicas a ambos núcleos frénicos.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.5., se inyectaron volúmenes de 50 a 100 nl de una solución de azul rápido

Fig 18. Actividad inspiratoria multiunitaria registrada en el núcleo frénico izquierdo (A) y derecho (B) correlacionada con los cambios en la concentración de CO₂ en el aire respirado. Barra: 1 segundo. C: Inyecciones de azul rápido (izquierda) y amarillo diamidino (derecha) en los núcleos frénicos a nivel de C4. Ambas inyecciones pertenecen al mismo experimento y se realizaron tras el registro de la actividad inspiratoria de las motoneuronas frénicas. El lado izquierdo muestra dos tractos (1 y 2) realizados con el electrodo. No se registró actividad respiratoria en 1 y sí en 2, donde se inyectó el marcador. Abreviaturas: N. Fren., núcleo frénico.



en el núcleo frénico derecho y de amarillo diamidino en el núcleo frénico izquierdo.

En los últimos cuatro animales, tres días antes de la inyección de los fluorocromos en la médula espinal cervical, se inyectó de 0,2 a 0,4 μ l de una solución de fluoro oro al 2% en agua destilada en los músculos laríngeos. Con ello se pretendió estudiar la posición relativa de las neuronas bulboespinales marcadas con azul rápido y/o amarillo diamidino respecto de las motoneuronas laríngeas del núcleo Ambiguo.

3.3.- TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizadas las intervenciones quirúrgicas, las heridas se limpiaron cuidadosamente y se cerraron con puntos de sutura con hilo de seda. Para protegerlas de posibles infecciones postoperatorias se les aplicó Veterín-fenicol en aerosol todos los días de supervivencia del animal. Además, se les administró una dosis de antibiótico (Ampicilina, 15 mg/Kg i.m.) y de corticoides (Dexametasona, 13 mg/Kg i.p.). Esto último con el fin de evitar reacciones alérgicas, así como para impedir la formación de edemas.

3.4.- PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS

3.4.1.- Perfusión y fijación

Tras un período de supervivencia de siete días tras la última intervención quirúrgica, se procedió a la perfusión de los animales. Estos se anestesiaron con pentobarbital sódico (Nembutal) a la dosis de 50 mg/Kg i.p. También se les suministró una pequeña dosis de heparina sódica al 5% (100 U.I.) (Boizot) por vía intravenosa, con el fin de evitar posibles coágulos sanguíneos en la circulación cerebral.

Todos los animales se perfundieron transcárdiacamente. Para ello, se les abrió la caja torácica del animal y se separó el pericardio del corazón. Seguidamente, se seccionó el ápice del ventrículo izquierdo y se introdujo una cánula rígida que se conectó a una bomba peristáltica (Masterflex, CoreParmer), produciéndose así un flujo continuo de líquido a nivel de la aorta ascendente (30 ml/min). La cánula se sujetó al ventrículo izquierdo mediante unas pinzas planas.

La perfusión se realizó según los siguientes pasos: primeramente, se realizó un lavado con suero salino (cloruro sódico al 0.9% al que se añadió nitrito sódico al 0.1% como anticoagulante) hasta limpiar de eritrocitos el tejido cerebral. Los volúmenes de solución salina variaron entre 250 y 500 ml según el peso del animal (volumen sanguíneo del animal). Seguidamente, se procedió a pasar la solución fijadora. Esta consistió en formalina al 10% disuelta en tampón fosfato (pH 7,4) 0,1 M (Kuypers y col., 1977). Los volúmenes utilizados variaron entre 250 y 500 ml, en relación al tamaño del animal. Por último, se pasó una solución de sacarosa al 10% en tampón fosfato (pH 7,4) 0,1 M (entre 250 y 500 ml), para evitar que el fijador formara cristales durante el proceso de congelación.

3.4.2.- Técnicas histológicas

Los cerebros se extrajeron del cráneo y antes de proceder a seccionar el tronco del encéfalo, se escogió el trozo comprendido entre las primeras raíces cervicales y el final de los tubérculos cuadrigéminos o techo óptico, zona donde se ubican las estructuras de interés en el presente trabajo: Grupo Respiratorio Ventral, Grupo Respiratorio Dorsal y centro neumotáxico. En los experimentos en los que se realizaron inyecciones en la médula espinal cervical, el límite caudal de la sección de cerebro se realizó a la altura de las primeras raíces espinales torácicas.

A continuación, se realizaron secciones coronales del tronco del encéfalo con la ayuda de un microtomo de congelación

(Reichert-Jung, modelo 1205), graduado a 50 μ . En los experimentos de inyección en la médula espinal cervical se procedió a seccionar desde los niveles de C3 a C6 de la médula espinal. Las secciones seriadas se recogieron ordenadas en bandejas compartimentadas llenas de agua destilada. En todos los casos, los cortes se montaron en portas previamente preparados con gelatina (Merck) al 0,25% y bisulfato crómico potásico (Merck) al 0,025% y se dejaron secar al aire durante una noche.

Se hicieron dos series paralelas, A y B. La serie A se deshidrató pasándola por una batería de alcoholes en concentración creciente y por último en xilol. La serie B se utilizó como referencia anatómica para la localización de los núcleos marcados. Para ello, se contratiñó con rojo neutro (1%) que marca los somas y el nucleolo neuronales de ese color. Seguidamente, ambas series se cubrieron con DPX (BDH).

3.5.- ESTUDIO Y ANALISIS DEL MATERIAL

Para la observación de las preparaciones se utilizó un microscopio Zeiss (D-7082 Oberkochen Axiophot) con epifluorescencia y sistema fotográfico automático incorporado.

Las preparaciones se iluminaron con luz ultravioleta de una longitud de onda de 360 nm y luz verde de 550 nm (Fig. 19). El estudio de cada uno de los cortes se realizó observándolos en oscuridad con un aumento mínimo de 10x, alternándolo con observaciones bajo luz blanca de las preparaciones contrateñidas; de este modo se tenía siempre referencia de la situación cartográfica de las neuronas marcadas respecto al núcleo estudiado y a los restantes núcleos colindantes.

Las neuronas marcadas con azul rápido o azul verdadero, marcadores fluorescentes con idénticas propiedades (Portillo, 1986), se reconocieron por presentar sus somas y dendritas proximales de color azul brillante al iluminarlas con la luz ultravioleta (Figs. 23 y 27), aunque aparecían gránulos de

fluorescencia en el nucleolo y en algunos núcleos de la glía próximos al soma, cuando se excede el tiempo de supervivencia óptimo (Bentivoglio y col., 1980). Las neuronas marcadas con amarillo diamidino presentaron sus núcleos de color amarillo verdoso al iluminarlas con luz ultravioleta (Fig. 27), aunque algo de fluorescencia apareció en el citoplasma y en las dendritas proximales cuando el tiempo de supervivencia fue excesivo (Keizer y col., 1983). Las neuronas marcadas con fluoro oro mostraron su citoplasma y dendritas de color amarillo dorado brillante (incluso blanquecinas cuando el marcaje fue muy intenso) al iluminarlas con luz ultravioleta (Figs. 23 y 27). A veces, también aparecieron teñidos los núcleos de la glia próximas a las neuronas marcadas, cuando se excedió el tiempo de supervivencia (Schmued y Fallon, 1986). Las neuronas marcadas con rodamina-B-isotiocianato manifestaron el citoplasma, y esporádicamente también las dendritas proximales, de color rojo intenso al iluminarlas con un haz de luz de 550 nm de longitud de onda (Fig. 23) (Thanos y Bonhoeffer, 1983).

La utilización de fluorocromos, que emiten distinto color (azul, amarillo verdoso, amarillo blanquecino) al iluminarlos con luz ultravioleta de igual longitud de onda (360 nm), y de color rojo al iluminarlos con luz verde (550 nm), nos permitió identificar hasta cuatro poblaciones neuronales diferentes dentro del mismo núcleo en una sola preparación. Para ello sólo hubo que cambiar el filtro de barrera tipo A (360 nm) al de tipo D (550 nm). De este modo, se pudieron establecer las relaciones espaciales de distintas poblaciones de neuronas que constituyen el GRV (Kuypers y col., 1980).

Los cuatro fluorescentes utilizados se caracterizan por ser captados por los terminales axónicos y transportados retrógradamente a través de los axones, acumulándose o bien en el soma o bien en el núcleo de las neuronas. Así pues, esta técnica también permite el estudio de la presencia de colaterales axónicas, ya que una misma neurona puede presentar el núcleo marcado de color amarillo verdoso y el soma de color azul (Fig. 37), si se observa con el filtro tipo A, y el soma de color rojo, cuando se cambia al

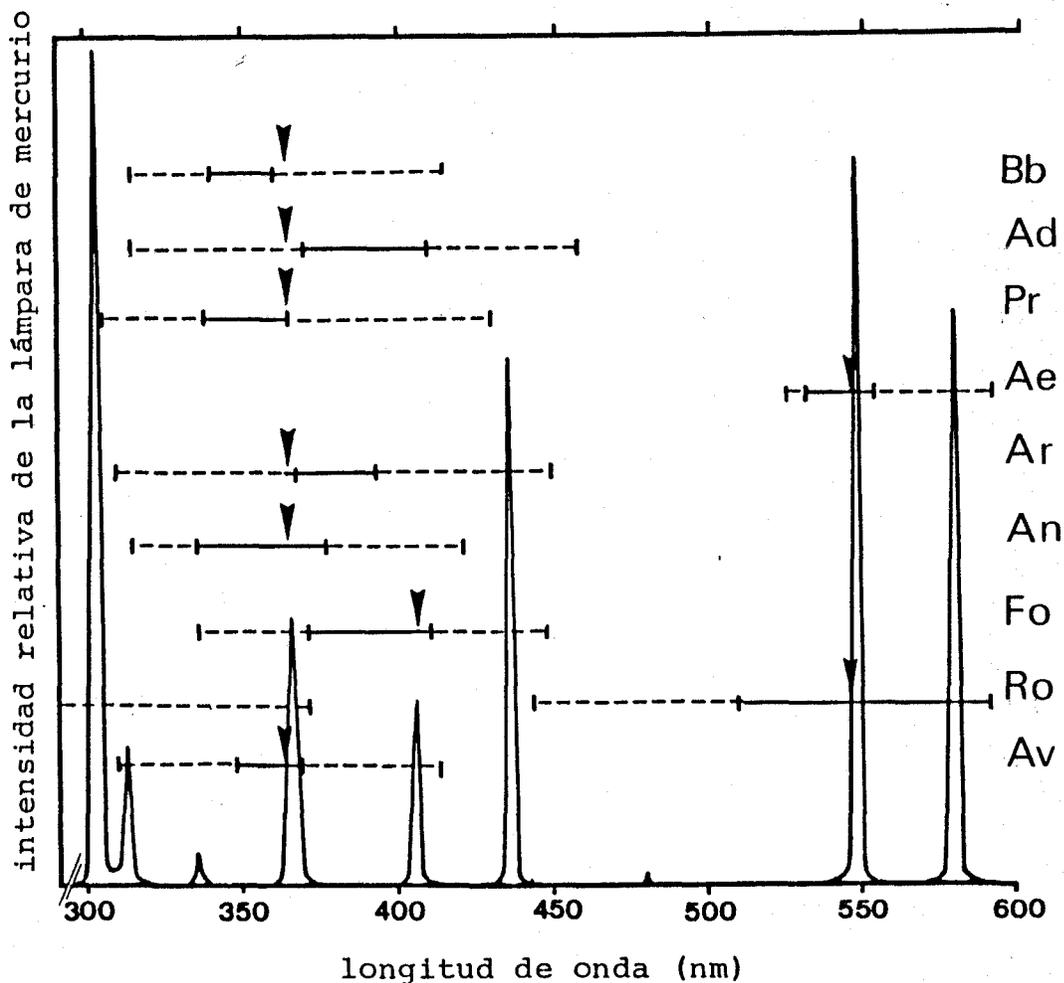


Fig. 19. Longitudes de onda a las que son excitados los fluorocromos más utilizados en técnicas de marcaje neuronal (ordenada a la derecha), e intensidad relativa de la luz emitida por la lámpara de mercurio (ordenada a la izquierda) desde 300 a 600 nm de longitud de onda (abcisa). Las flechas indican el pico de emisión de la lámpara que proporciona una excitación óptima en el microscopio de fluorescencia para cada compuesto; la línea continua indica la longitud de onda a la que cada fluorocromo emite entre el 90 y el 100% de su fluorescencia máxima. Abreviaturas: Ad, amarillo diamidino; Ae, azul de evans; An, amarillo nuclear; Ar, azul rápido; Av, azul verdadero, Bb, bisbenzimidá; Fo, fluoro oro; Pr, primulina; Ro, rodamina-B-isotiocianato; (adaptado de Skirboll y col., 1984).

filtro tipo D (Keizer y col., 83). En estos casos dichas neuronas están doble o triplemente marcadas.

Por último, los cortes histológicos en los que aparecieron neuronas marcadas se dibujaron con ayuda de una cámara clara (Zeiss) acoplada al microscopio. Las medidas de las neuronas se tomaron utilizando un ocular graduado, cuyas divisiones a diferentes aumentos se calibraron con la ayuda de un porta micrométrico (Olympus). Seguidamente, mediante dos cámaras fotográficas acopladas al microscopio y conectadas a un sistema automático de disparo, se fotografiaron todos los cortes de interés para este estudio.

Diferentes tipos de películas fotográficas se utilizaron según el material a estudiar. Para fotografías de inyecciones de tejido contrateñido con rojo neutro se utilizaron películas Agfa copex rapid tri 13, de 32 ASA (blanco y negro) y Kodak Ektachrome de 160 ASA (color). Para fotografiar neuronas marcadas con los trazadores fluorescentes se utilizaron películas de alta sensibilidad, tales como Kodak tri-X pan 400 ASA (blanco y negro) y Kodak Ektachrome 400 ASA (color). En todos los casos, se emplearon diferentes tiempos de exposición, que se modificaron en función de los valores calculados por el sistema automático.

Como punto de referencia se tomó el borde rostral del área postrema (interaural -4,3 mm, bregma -13,3 mm, atlas de Paxinos y Watson 1986) para la cuantificación y distribución de los resultados obtenidos en el presente trabajo. A este punto se le asignó el valor cero. Los diagramas de los cortes coronales de médula cervical y tronco del encéfalo que se muestran en las distintas figuras de resultados indican la distancia en mm a dicho punto de referencia o cero. Clásicamente, este punto de referencia ha recibido el nombre de óbex en la rata, por su similitud con el óbex definido para gatos (unión del canal central con el cuarto ventrículo). Sin embargo, el óbex morfológico en la rata, debido a la distinta disposición del área postrema respecto del gato, se encuentra aproximadamente unas 400 μ caudal a dicho punto.

4.- RESULTADOS

4.1.- CARACTERIZACION DE LAS NEURONAS CRANEALES DEL NUCLEO AMBIGUO

En el presente apartado se pretendió examinar en detalle la organización citoarquitectónica de los distintos grupos de motoneuronas que constituyen el núcleo Ambiguo, usando el marcaje neuronal por transporte axónico retrógrado mediante la inyección de uno o hasta cuatro marcadores fluorescentes, simultáneamente. Con esta técnica se podría demostrar lo siguiente: i) la obtención de neuronas doble o triplemente marcadas sugeriría la presencia de ramificaciones axonales que proyectan a distintos músculos y ii) la organización viscerotópica del núcleo Ambiguo .

4.1.1.- Localización de las motoneuronas

Las neuronas marcadas tras la inyección con fluoro oro o azul rápido de los nervios y músculos que se citan en material y métodos (apartado 3.2.1.), lo fueron exclusivamente homolaterales al lado inyectado. Estas aparecieron a todo lo largo del eje rostrocaudal del núcleo Ambiguo; si bien los distintos grupos de motoneuronas o de neuronas preganglionares, de cada nervio o músculo inyectado, ocuparon una localización muy determinada dentro de la columna longitudinal de células que constituye el núcleo Ambiguo, tal y como se detalla a continuación:

i) Las motoneuronas que inervan el músculo estilofaríngeo se encontraron en la zona más rostral del núcleo Ambiguo, situadas justo dorsales a la división medial del núcleo facial, desde 1,6 mm hasta 2,1 mm rostrales al punto de referencia tomado como cero

(Fig. 20A). El pico máximo de densidad de neuronas marcadas se localizó en 1,7 mm.

Cuando se inyectó el nervio estilofaríngeo, junto con la población de motoneuronas del músculo estilofaríngeo, se marcó una población de neuronas fusiformes localizada en el núcleo Ambiguo, desde 1,2 hasta 1,5 mm. A éstas últimas se las denominó neuronas parasimpáticas del nervio glosofaríngeo (Figs. 20E, 23 y 24A), ya que dicho nervio sólo inerva un músculo (el estilofaríngeo) y, de ahí, que no pueda tratarse de otra población de motoneuronas. La concentración máxima de neuronas marcadas se presentó en el punto 1,5 mm rostrales al cero.

ii) Cuando se inyectaron los músculos constrictores faríngeos y/o las ramas faríngeas del vago, se observó una población de neuronas marcadas ocupando posiciones desde el cero hasta 1,5 mm rostrales al mismo (Figs. 24A y B). El máximo de concentración neuronal se localizó a 1 mm rostral al cero (Fig. 20D).

iii) Cuando se inyectó el músculo cricotiroideo, inervado por el nervio laríngeo superior, las motoneuronas marcadas se ubicaron desde 0,8 hasta 1,7 mm rostrales al cero, presentando una distribución en meseta, con una concentración un poco mayor que la anterior en 1,3 mm (Figs. 20C, 23 y 24A-C).

iv) La inyección de fluorescentes en el nervio laríngeo recurrente marcó motoneuronas en las porciones más caudales del núcleo Ambiguo, distribuidas desde 1,1 mm caudales al cero hasta 0,9 mm rostrales al mismo. Aunque el nervio laríngeo recurrente inerva cuatro músculos intrínsecos de la laringe (cricoaritenoideo lateral, cricoaritenoideo posterior, tiroaritenoideo e interaritenoideo), el conjunto de dichas motoneuronas presentó una distribución sencilla (Fig. 24C-D). Así, sólo se observó un pico máximo de densidad situado en 0,3 mm caudales al cero (Fig. 20H).

(v) Tras la inyección de fluorescentes en el extremo distal del nervio vago aparecieron marcadas tres poblaciones neuronales que se distinguieron fácilmente por su morfología y distribución dentro del propio núcleo Ambiguo.

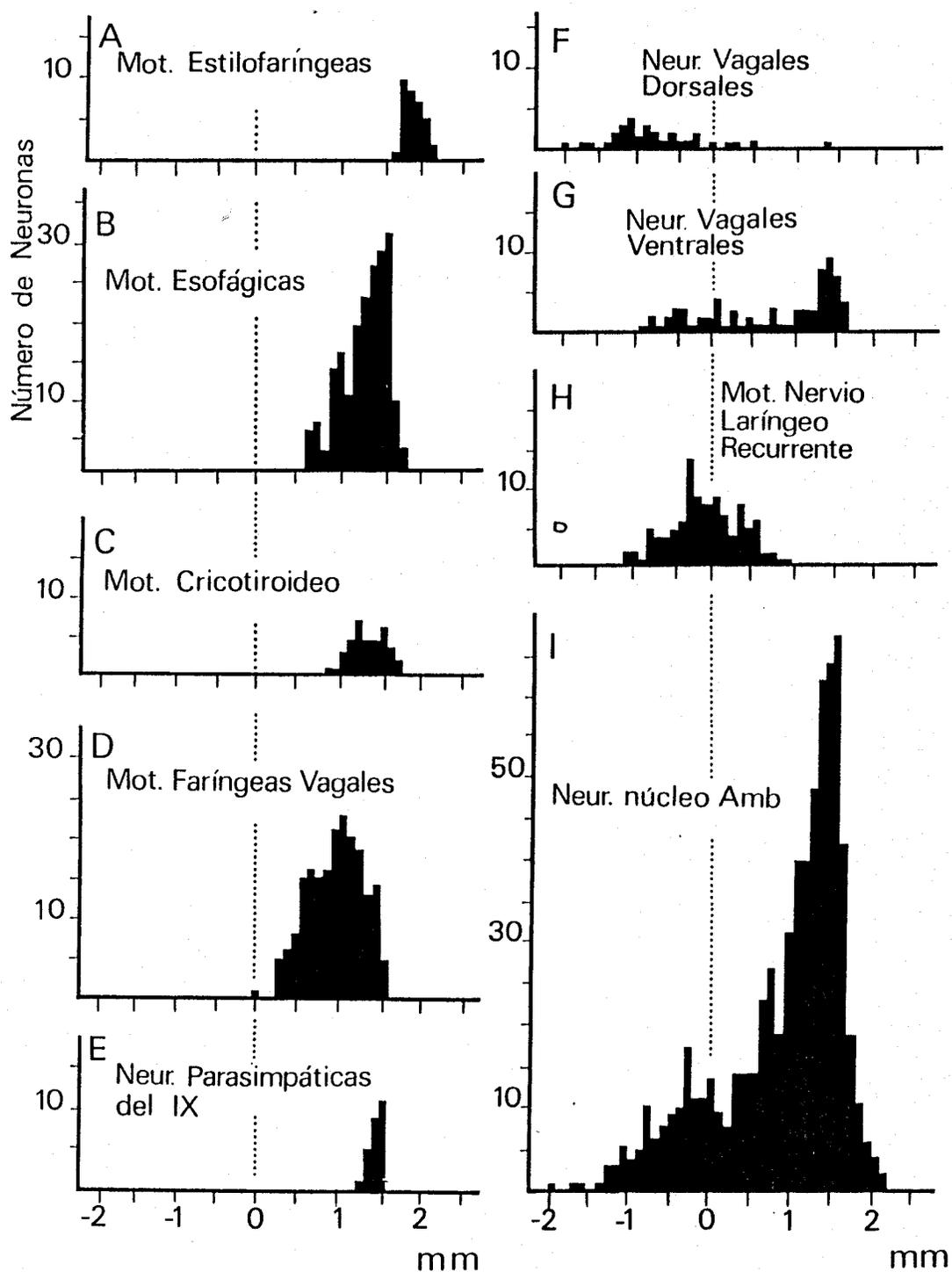


Fig. 20. Histogramas de frecuencias de las neuronas marcadas a lo largo del eje rostrocaudal del núcleo Ambiguo (Amb). En abcisas se representa la distancia en milímetros respecto del borde rostral del área postrema, tomado como cero. En ordenadas se representa el número de neuronas marcadas. Abreviaturas: Mot., motoneuronas; Neur., neuronas; IX, glossofaríngeo.

La primera de las poblaciones determinadas se corresponde con la previamente descrita de motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente. Es decir, motoneuronas de gran tamaño, de morfología multipolar, dispuestas de forma laxa y localizadas en los niveles más caudales del núcleo Ambiguo (Fig. 24C-D).

La segunda población se corresponde con las motoneuronas esofágicas (Fig. 20B). Estas neuronas marcadas, de pequeño tamaño y casi esféricas, se localizaron densamente agrupadas en la porción rostral del núcleo Ambiguo, desde 0,7 hasta 1,8 mm rostrales al cero (Fig. 23).

Por último, una tercera población de neuronas, de tamaño muy pequeño y morfología fusiforme, situadas o bien en posiciones muy dorsales o bien en posiciones muy ventrales dentro del propio núcleo Ambiguo. Las primeras se ubicaron casi exclusivamente caudales al cero; mientras que las segundas presentaron una localización más amplia, con un pico de concentración de neuronas máximo a 1,4 mm rostrales al cero (Fig. 23). Estas neuronas se describieron como neuronas vagales dorsales y neuronas vagales ventrales, respectivamente, cuya distribución se representa en la figura 20F y G.

4.1.2.- Localización relativa de unas motoneuronas respecto de otras

La localización relativa de las motoneuronas y neuronas preganglionares parasimpáticas del núcleo Ambiguo se observó en los experimentos de inyección de diferentes marcadores diferentes simultáneamente.

En el primer experimento se inyectó con fluoro oro los músculos constrictores faríngeos, el músculo estilofaríngeo y el nervio glossofaríngeo; con azul rápido el músculo cricotiroideo; con rodamina-B-isotiocianato el extremo distal del nervio vago; y con amarillo diamidino el nervio laríngeo recurrente (rama filial del nervio vago). Los resultados experimentales fueron los siguientes:

i) Las motoneuronas faríngeas (tanto inervadas por el vago como por el glossofaríngeo) y las neuronas preganglionares parasimpáticas (del nervio glossofaríngeo) se marcaron con fluoro oro y aparecieron al microscopio de color amarillo blanquecino tras iluminarlas con luz ultravioleta. Ambos subgrupos de motoneuronas faríngeas fueron indistinguibles en función de su morfología. Sin embargo, se consideraron motoneuronas faríngeas vagas a las neuronas localizadas caudales a la coordenada 1,6 mm rostral al cero y faríngeas del glossofaríngeo a las localizadas rostrales a dicho punto, en base a los resultados previos. A pesar de que ambos tipos neuronales estaban marcados con el mismo fluorocromo, las neuronas preganglionares se distinguieron con facilidad de las dos poblaciones de motoneuronas faríngeas por su diferente morfología y tamaño (Fig. 23).

ii) Las motoneuronas del músculo cricotiroides se marcaron con azul rápido, presentando el soma y las dendritas primarias una fluorescencia azul brillante cuando se iluminaron con luz ultravioleta (Fig. 23);

iii) Las motoneuronas esofágicas y neuronas preganglionares del nervio vago se marcaron con rodamina, apareciendo sus somas y dendritas marcadas en rojo. Estas dos poblaciones se distinguieron fácilmente entre sí en función de su morfología y localización, determinadas previamente (apartado 4.1.1) (Fig. 23).

iv) Las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente, doblemente marcadas con amarillo diamidino y rodamina, presentaron el núcleo amarillo y el soma y dendritas en rojo brillante. Este doble marcaje se debió a la inyección en el nervio laríngeo recurrente con un marcador (amarillo diamidino) y en el nervio vago (su nervio parental) con otro (rodamina-B-isotiocianato); de ahí que los axones de dichas motoneuronas captaran ambos fluorescentes. Las motoneuronas marcadas doblemente se diferenciaron claramente de las motoneuronas esofágicas y de las neuronas parasimpáticas vagas.

(v) No se encontró ninguna evidencia de la presencia en el núcleo Ambiguo de motoneuronas que inerven más de un músculo mediante colaterales axónicas; puesto que no se encontraron

neuronas doble o triplemente marcadas (a excepción de las ya comentadas, que resultaron ser un artefacto metodológico). No obstante, neuronas que capturaran azul rápido y fluoro oro a la vez podrían ser reconocidas difícilmente como doblemente marcadas, ya que ambos fluorescentes tiñen el soma y las dendritas proximales y se observan al microscopio de epifluorescencia con la misma longitud de onda (ver apartado 3.5.). Así pues, se realizó un segundo experimento de marcaje múltiple para solventar las dudas, creadas por el método, respecto de la innervación de los músculos constrictores faríngeos y el músculo cricotiroideo mediante colaterales axónicas.

En este experimento se inyectó con amarillo diamidino el músculo cricotiroideo; con azul rápido los músculos constrictores faríngeos y con fluoro oro el nervio vago. Los resultados obtenidos tampoco aportaron evidencia alguna sobre la existencia de motoneuronas o neuronas preganglionares parasimpáticas del núcleo Ambiguo que envíen colaterales axónicas innervando más de un músculo; puesto que no se encontró ninguna neurona doblemente marcada.

El núcleo Ambiguo, tomado como conjunto, presenta una mayor densidad de células marcadas en dirección rostral, alcanzando un pico máximo en el punto 1,5 mm rostrales al cero (Fig. 20I). En el plano coronal, las neuronas del núcleo Ambiguo formaron una agregación en forma de huso (Fig. 24A y B). Esta columna de células, así como las arborizaciones dendríticas de las neuronas que compone el núcleo Ambiguo, presentaron una orientación preferente hacia el núcleo del tracto Solitario (Fig. 24A-D).

Los experimentos de múltiple marcaje neuronal demostraron, al mismo tiempo, la organización viscerotópica que posee el núcleo Ambiguo. Así, cada subgrupo de motoneuronas o neuronas preganglionares del núcleo Ambiguo ocupó una posición muy precisa, tanto en el eje rostrocaudal como en el eje dorsoventral. Esta distribución específica fue la siguiente:

i) En niveles caudales a 1,2 mm caudales al cero, sólo se encontraron neuronas parasimpáticas vagales (Fig. 20F). Estas ocuparon posiciones muy dorsales respecto del bulbo ventrolateral.

ii) Entre 1,1 mm caudales al cero y 0,2 mm rostrales al mismo, se localizaron motoneuronas laríngeas, cuyos axones viajan por el nervio laríngeo recurrente, en el centro del núcleo Ambiguo, formando pequeños grupos de 3 a 7 neuronas. Las neuronas parasimpáticas ubicadas en esta porción del núcleo Ambiguo lo fueron dorsales y ventrales a las anteriores (Figs. 21F y 22).

iii) Entre 0,3 y 0,9 mm rostrales al cero, las motoneuronas mostraron una distribución más compacta. El borde caudal de esta porción estuvo definido por la aparición de motoneuronas faríngeas vagales (Figs. 21E, 22 y 24D) y el rostral por la aparición de motoneuronas del músculo cricotiroides. La presencia de una alta densidad de motoneuronas esofágicas y la desaparición de las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente fue la característica principal de esta subdivisión del núcleo Ambiguo (Fig. 21C). Las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente se localizaron ventromediales y ventrolaterales respecto de las motoneuronas faríngeas, sugiriendo que dichas motoneuronas laríngeas pueden dividirse en dos subgrupos en el plano coronal (Figs. 21E y 24D). Las neuronas esofágicas marcadas se ubicaron en la parte rostral de esta región, laterales a las faríngeas pero muy claramente separadas de éstas (Fig. 21C); así como las motoneuronas del músculo cricotiroides, en posiciones muy ventrales (Fig. 24C), y algunas neuronas vagales ventrales o ventrolaterales a las motoneuronas (Fig. 21C y D).

iv) La mayor densidad neuronal y complejidad del núcleo Ambiguo se encontró entre 1 y 1,6 mm rostrales al cero. Las poblaciones de las neuronas que inervan el esófago, la faringe (a través de las ramas faríngeas del vago) y el músculo cricotiroides, además de las neuronas parasimpáticas vagales y del glossofaríngeo se solaparon en este nivel del núcleo (Figs. 21A, 22 y 24A). A pesar de dicha imbricación, se demostró una compleja organización topográfica de las diferentes poblaciones neuronales en el plano coronal (Figs. 21A-B y 23). Las neuronas esofágicas se dispusieron en el centro del núcleo, muy compactamente. Las motoneuronas faríngeas se situaron siempre mediales y ventrales respecto de las motoneuronas esofágicas, aunque a nivel de 1,6 mm rostrales al cero ambas poblaciones mostraron un cierto grado de solapamiento (Figs.

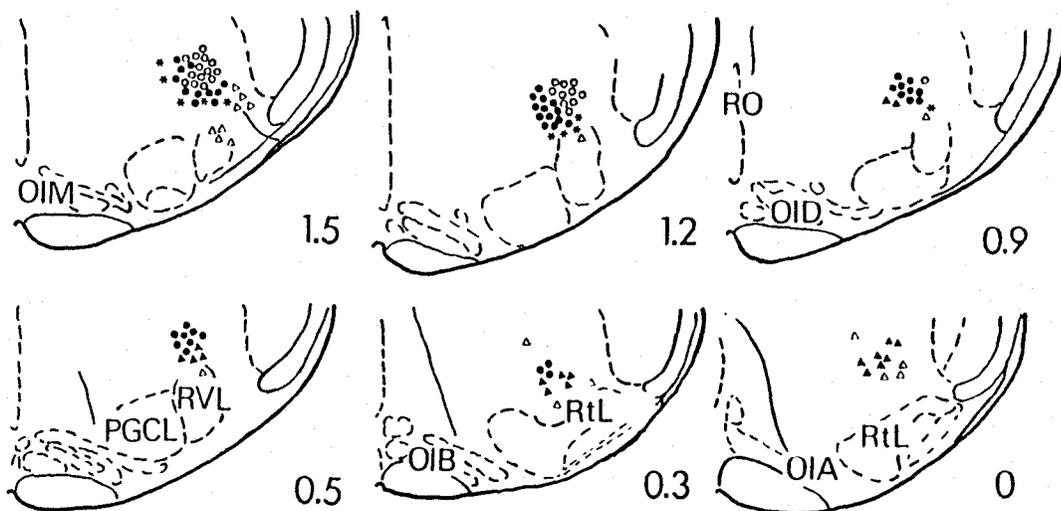


Fig. 21. Diagramas representativos de 6 secciones coronales del bulbo de la rata, mostrando la localización de los somas de las diferentes poblaciones neuronales marcadas retrógradamente en el núcleo Ambiguo. (○), motoneuronas esofágicas; (●) motoneuronas faríngeas; (*) motoneuronas del cricotiroideo; (△) neuronas preganglionares parasimpáticas; (▲) motoneuronas del nervio laríngeo recurrente. Abreviaturas: OIA, subnúcleo medial A de la oliva inferior; OIB, subnúcleo medial B de la oliva inferior; OIB, núcleo dorsal de la oliva inferior; RO, núcleo del rafe oscuro; Rtl, núcleo reticular lateral; RVL, núcleo reticular rostroventrolateral. Coordenadas: como en la figura 20.

23 y 24A). Las motoneuronas del cricotiroideo se hallaron ventrales a las motoneuronas esofágicas y faríngeas, y, sólo ocasionalmente, alguna neurona se localizó medial o dorsomedial a las anteriores (Figs. 23 y 24A y B). Las neuronas parasimpáticas vagales formaron un grupo muy compacto, situado ventral a las motoneuronas, aunque algunas de ellas también se localizaron ventrolaterales, entremezcladas con el grupo de neuronas parasimpáticas glossofaríngeas (Fig. 24A).

Entre 1,7 y 2,1 mm rostrales al cero, el número de neuronas marcadas decreció rápidamente (Fig. 20I). Esta sección del núcleo Ambiguo, situada dorsal al núcleo facial, es la más rostral del mismo. En esta región se localizaron las motoneuronas faríngeas del nervio glossofaríngeo, mediales respecto de las últimas motoneuronas esofágicas.

4.2.- CARACTERIZACION DE LA ORGANIZACION TOPOGRAFICA DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

En el presente apartado se pretendió examinar en detalle la organización anatómica de los distintos grupos de motoneuronas, neuronas propiobulbares y neuronas bulboespinales que constituyen el GRV, mediante la inyección simultánea de tres marcadores neuronales fluorescentes por transporte axónico retrógrado. Esta técnica podría demostrar: i) las posibles ramificaciones axonales si se encontraban neuronas doble o triplemente marcadas y ii) la organización topográfica del GRV.

4.2.1.- Neuronas propiobulbares

El marcador amarillo diamidino se inyectó en el bulbo ventrolateral donde se registró predominantemente actividad espiratoria. El fluorocromo difundió, en todos los casos, en un área situada, en el eje rostrocaudal, entre 1 y 1,5 mm caudales al punto de referencia tomado como cero (borde rostral del área postrema). El área de difusión, en el eje dorsoventral, abarcó el núcleo Ambiguo y el núcleo reticular ventrolateral caudal; pero

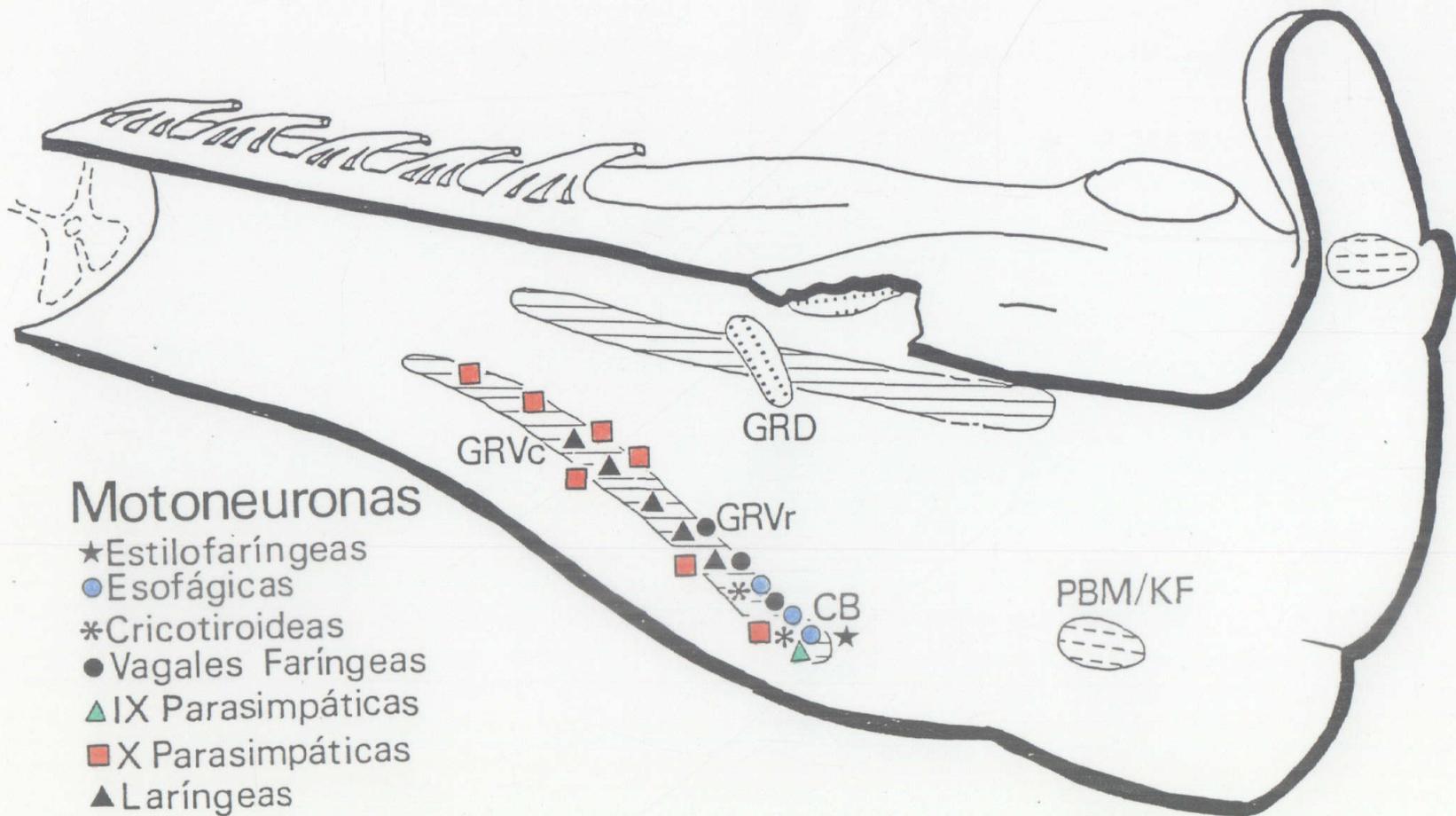
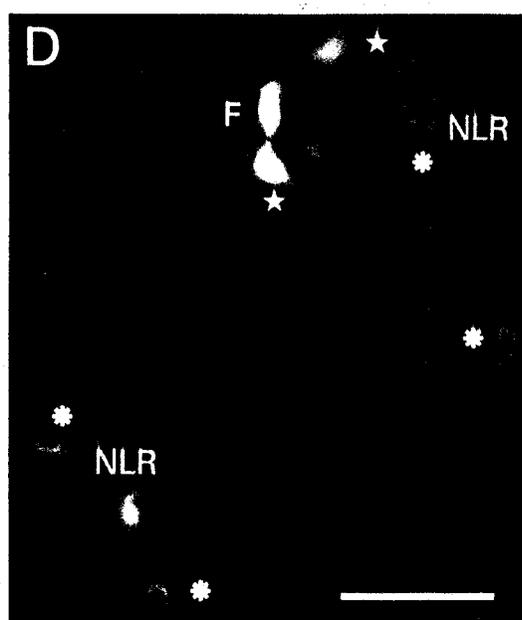
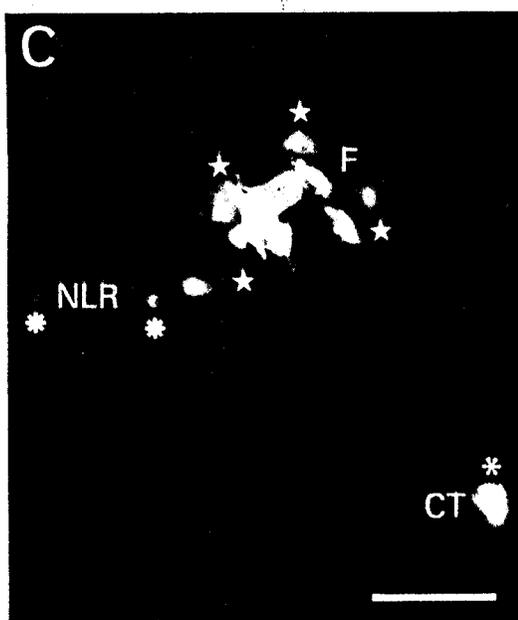
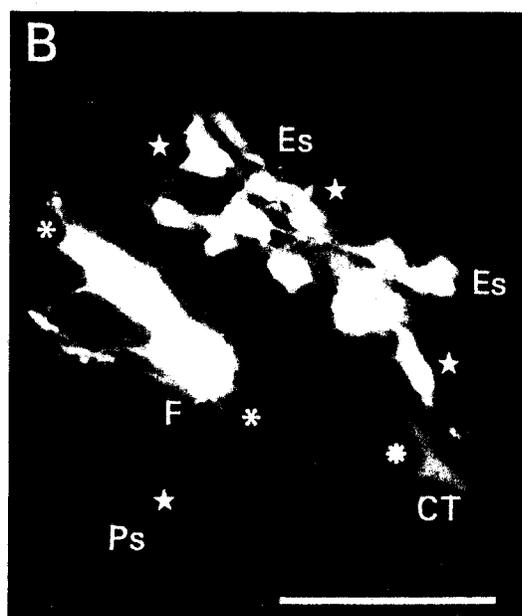
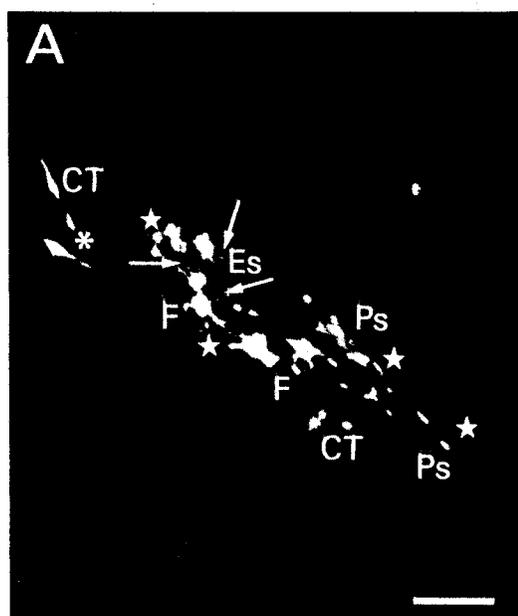


Fig. 22. Esquema ilustrativo del bulbo y protuberancia mostrando la localización, a lo largo de su eje rostrocaudal, de las diferentes poblaciones neuronales marcadas retrógradamente en el núcleo Ambiguo. Abreviaturas como en la figura 9.

Fig. 23. Microfotografía de fluorescencia de neuronas marcadas retrógradamente con distintos fluorocromos en el núcleo Ambiguo a nivel de 1,6 mm rostrales al cero. Abreviaturas: CT, motoneuronas del cricotiroideo; Es, motoneuronas esofágicas; F, motoneuronas faríngeas; Ps, neuronas preganglionares parasimpáticas. Barra: 25 μ . (*) neuronas marcadas con azul rápido; flechas, neuronas marcadas con rodamina; (★) neuronas marcadas con fluoro oro.



Fig. 24. Microfotografías de fluorescencia de neuronas marcadas retrógradamente con distintos fluorocromos en el núcleo Ambiguo. A: Motoneuronas del cricotiroideo (CT); motoneuronas esofágicas, (Es) motoneuronas faríngeas (F) y neuronas preganglionares parasimpáticas (Ps) en la parte más rostral del núcleo ambiguo (1,5 mm). B: Motoneuronas esofágicas, motoneuronas faríngeas, motoneuronas del cricotiroideo y neuronas parasimpáticas en la parte rostral del núcleo ambiguo (1,2 mm). C: motoneuronas faríngeas, motoneuronas del nervio laríngeo superior, y motoneuronas del cricotiroideo en el nivel 0,8 mm rostrales al cero. D: Motoneuronas faríngeas y motoneuronas del nervio laríngeo recurrente (NLR) en el nivel 0,3 mm rostrales al cero. Barra: 100 μ . Símbolos: (*) neuronas marcadas con azul rápido; (↗) neuronas marcadas con rodamina; (★) neuronas marcadas con fluoro oro y (✱) neuronas marcadas con amarillo diamidino.



nunca alcanzó el núcleo reticular lateral (Fig. 13C y D). Así pues, este área se identificó como GRV caudal.

Aparecieron neuronas marcadas con amarillo diamidino, tras la inyección del mismo en el GRV caudal (Fig. 13C), a todo lo largo del bulbo raquídeo, pero sólo se contabilizaron las neuronas localizadas dentro de la región que constituye el GRV (Fig. 25A); es decir, en el núcleo Ambiguo y formación reticular adyacente. Los resultados globales fueron los siguientes:

i) en el área rostral a la inyección, es decir desde 1 mm caudales al cero hasta 2 mm rostrales al mismo, la mayoría de las neuronas marcadas (media de células marcadas por animal, $n= 682$, rango 532-795, 65%) lo fueron homolateralmente y el resto ($n= 353$, rango 256-398, 35%) contralaterales al sitio de inyección;

ii) una media de 80 neuronas marcadas (rango 65-100) se encontró contralateralmente al sitio de inyección; y

iii) un promedio de 65 neuronas marcadas (rango 38-145) se obtuvo en el lado homolateral, caudal a la inyección, y una media de 31 neuronas (rango 11-60) en el lado contralateral. Estos datos dan un porcentaje de proyección homolateral del 68% y contralateral del 32% hacia el GRV caudal.

La densidad de neuronas marcadas varió a lo largo del eje rostrocaudal del GRV. El pico máximo de densidad se observó 0,5 mm caudales al cero, en el lado homolateral, en una zona muy cercana al lugar de la inyección. La densidad de células marcadas a 1 mm rostral al cero fue similar en ambos hemibulbos (Fig. 25A).

Un 67% de las células marcadas (media 806 y rango 632-995) en el GRV, se localizaron ventrales al núcleo Ambiguo y las restantes (33%) dorsales al mismo. La distribución de estos dos subgrupos de neuronas fue diferente a lo largo del eje rostrocaudal del GRV. Las neuronas localizadas dorsales al núcleo Ambiguo fueron mucho más numerosas en los niveles más caudales del núcleo (entre 1 y 0,5 mm caudales al cero; Fig. 25D). Sin embargo, las neuronas ventrales al núcleo Ambiguo se distribuyeron de forma más homogénea a lo largo

Fig. 25. Histogramas de frecuencias de las neuronas marcadas a lo largo del eje rostrocaudal del GRV. A: Neuronas propiobulbares que proyectan al GRV caudal. B: Neuronas bulboespinales que proyectan al núcleo frénico. C: Motoneuronas del núcleo Ambiguo. D-G: Las neuronas propiobulbares y bulboespinales se subdividieron en dos grupos de acuerdo con su localización, en el plano coronal, con respecto al núcleo Ambiguo. Ordenadas: media de células marcadas, en dos experimentos, en secciones de 100 μ de grosor. Abcisas: localización rostrocaudal de las secciones; cero definido como el borde rostral del área postrema. Izquierda, caudal; derecha, rostral. Abreviaturas: h, homolateral; c, contralateral; N. Prop., neuronas propiobulbares; N. bulb., neuronas bulboespinales.

del eje rostrocaudal del GRV, aunque en mayor número en el lado homolateral (Fig. 25E).

4.2.2.- Neuronas bulboespinales

Las inyecciones de azul rápido se realizaron en la parte rostral del núcleo frénico, a nivel de C4, en el centro de un área donde se registró actividad inspiratoria (Fig. 13B). El volumen de marcador inyectado fue lo suficientemente grande como para alcanzar los axones de paso de las neuronas bulboespinales que terminan en la parte más caudal del núcleo frénico. De este modo se aseguró la captación del fluorocromo por la mayoría de los axones bulboespinales, ya que el área de difusión alcanzó la sustancia blanca ventral (Fig. 13A). Las neuronas marcadas se encontraron a todo lo largo del bulbo raquídeo, pero sólo se contabilizaron aquellas situadas dentro del GRV definido previamente.

Se contabilizó una media de 496 (rango 314-524) neuronas bulboespinales marcadas. Esta media fue menor que la de las neuronas propiobulbares estudiadas en el apartado anterior.

El 65% de las neuronas bulboespinales se ubicaron homolaterales al sitio de inyección (media 322, rango 219-368). No se incluyeron las neuronas situadas en la porción del GRV caudal inyectada con amarillo diamidino, ya que no se pudieron visualizar correctamente al microscopio.

Neuronas marcadas con azul rápido se hallaron distribuidas a todo lo largo del eje rostrocaudal del GRV (Fig. 25B). El 50% de estas neuronas (media de 268, rango 195-317) se localizaron ventrales al núcleo Ambiguo, presentando una proyección preferentemente homolateral en la zona más rostral del GRV (Fig. 25G). El 50% restante se halló dorsal al núcleo Ambiguo, exhibiéndose una mayor densidad de células marcadas en los niveles más caudales de dicho núcleo (Fig. 25F).

La orientación de los árboles dendríticos de las neuronas bulboespinales en el plano coronal fue dorsomedial, dirigiéndose

hacia el núcleo del tracto Solitario, y ventrolateralmente, hacia la superficie bulbar ventral.

4.2.3.- Motoneuronas

Las motoneuronas del núcleo Ambiguo se marcaron tras la inyección de fluoro oro en los músculos y nervios que se describieron en Material y Métodos (apartado 3.2.1).

Las neuronas marcadas aparecieron en menor cantidad en la zona caudal del núcleo Ambiguo, incrementándose su número en la dirección rostral del mismo. El pico máximo de densidad se encontró a 1,5 mm rostrales al cero. En niveles rostrales a 1,6 mm, el número de motoneuronas marcadas se fue haciendo mucho menor hasta alcanzar el nivel 2 mm rostrales al cero. Rebasado dicho punto, no se detectó la presencia de neuronas marcadas. Esta distribución, a su vez, presentó pequeños picos de densidad de marcaje; o lo que es lo mismo, se agruparon preferentemente según las diferentes subpoblaciones de neuronas que constituyen el núcleo Ambiguo (i.e.: laríngeas, faríngeas, esofágicas y neuronas parasimpáticas) (Fig. 25C).

La arborización dendrítica de las motoneuronas se orientó dorsomedialmente, hacia el núcleo del tracto Solitario, las dendritas dorsales y ventrolateralmente, hacia el borde bulbar ventral, las dendritas ventrales.

4.2.4.- Organización en el Grupo Respiratorio Ventral de las neuronas propiobulbares, bulboespinales y motoneuronas

En primer lugar, hay que destacar que no aparecieron neuronas doblemente marcadas.

Los experimentos de multiple marcaje neuronal demostraron la elevada organización topográfica que posee el GRV. Así, cada población neuronal (neuronas propiobulbares, bulboespinales o motoneuronas) ocupó una posición muy precisa, tanto en el eje

rostrocaudal como en el eje dorsoventral dentro del GRV. La distribución fue la siguiente:

Caudal a 1,3 mm caudales al cero, sólo se encontraron algunas motoneuronas (y/o neuronas parasimpáticas) del núcleo Ambiguo, entremezcladas con las neuronas propiobulbares y bulboespinales marcadas (Fig. 26D). Las primeras mostraron una distribución muy laxa, la mayoría de ellas de pequeño tamaño y de forma fusiforme, sugiriendo una naturaleza parasimpática (Fig. 28D).

Entre 1,3 mm caudales al cero y 0,3 mm rostrales al mismo, las neuronas marcadas presentaron una distribución laxa (Figs. 26C y 28C). La gran mayoría de las motoneuronas se localizaron en el centro del GRV, aunque algunas de ellas ocuparon posiciones más dorsomediales o más ventrolaterales. Las neuronas bulboespinales se localizaron en las posiciones más distantes del núcleo Ambiguo. Las neuronas bulboespinales dorsales se encontraron disgregadas; mientras que las neuronas bulboespinales ventrales se dispusieron agrupadamente. Algunas de las neuronas bulboespinales se hallaron entremezcladas con las neuronas propiobulbares, rodeando a las motoneuronas (Figs. 26C y 28C). En esta zona del núcleo Ambiguo, las motoneuronas se organizaron en forma laxa, aunque algunas formando grupos de 3 a 5 neuronas, separados entre sí por somas propiobulbares e, incluso a veces, bulboespinales. El conjunto de las tres poblaciones neuronales en el plano coronal del GRV se asemejó a una columna de células, orientada en dirección dorsomedial hacia el núcleo del tracto Solitario y cuyo límite ventral fue el núcleo reticular lateral y más estrecha en su parte dorsomedial (Figs. 26C y 28C).

Entre 0,4 y 1 mm rostrales al cero, las motoneuronas se agruparon más densamente que en las secciones del GRV anteriores, observándose con claridad los límites del núcleo Ambiguo. No se encontraron neuronas propiobulbares o bulboespinales entremezcladas con las motoneuronas. En general, los diferentes tipos de neuronas formaron grupos más compactos. La gran mayoría de las neuronas propiobulbares ocuparon posiciones ventrales al núcleo Ambiguo y, a su vez, las neuronas bulboespinales presentaron una distribución preferentemente ventral o ventrolateral a las neuronas

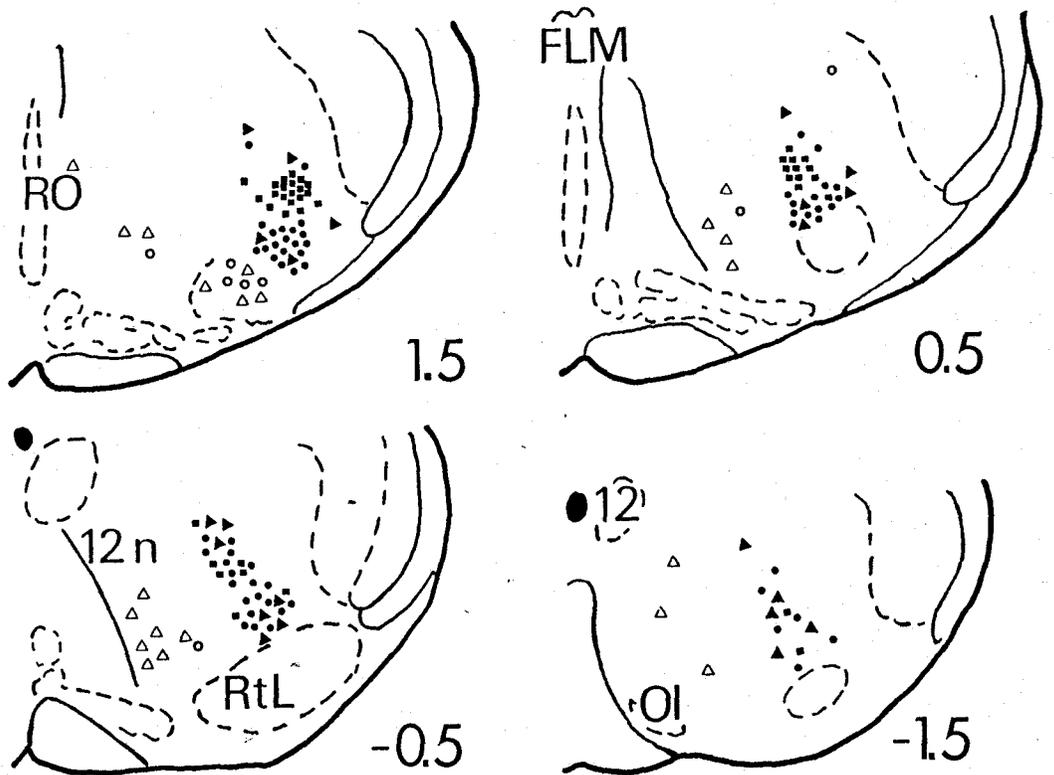
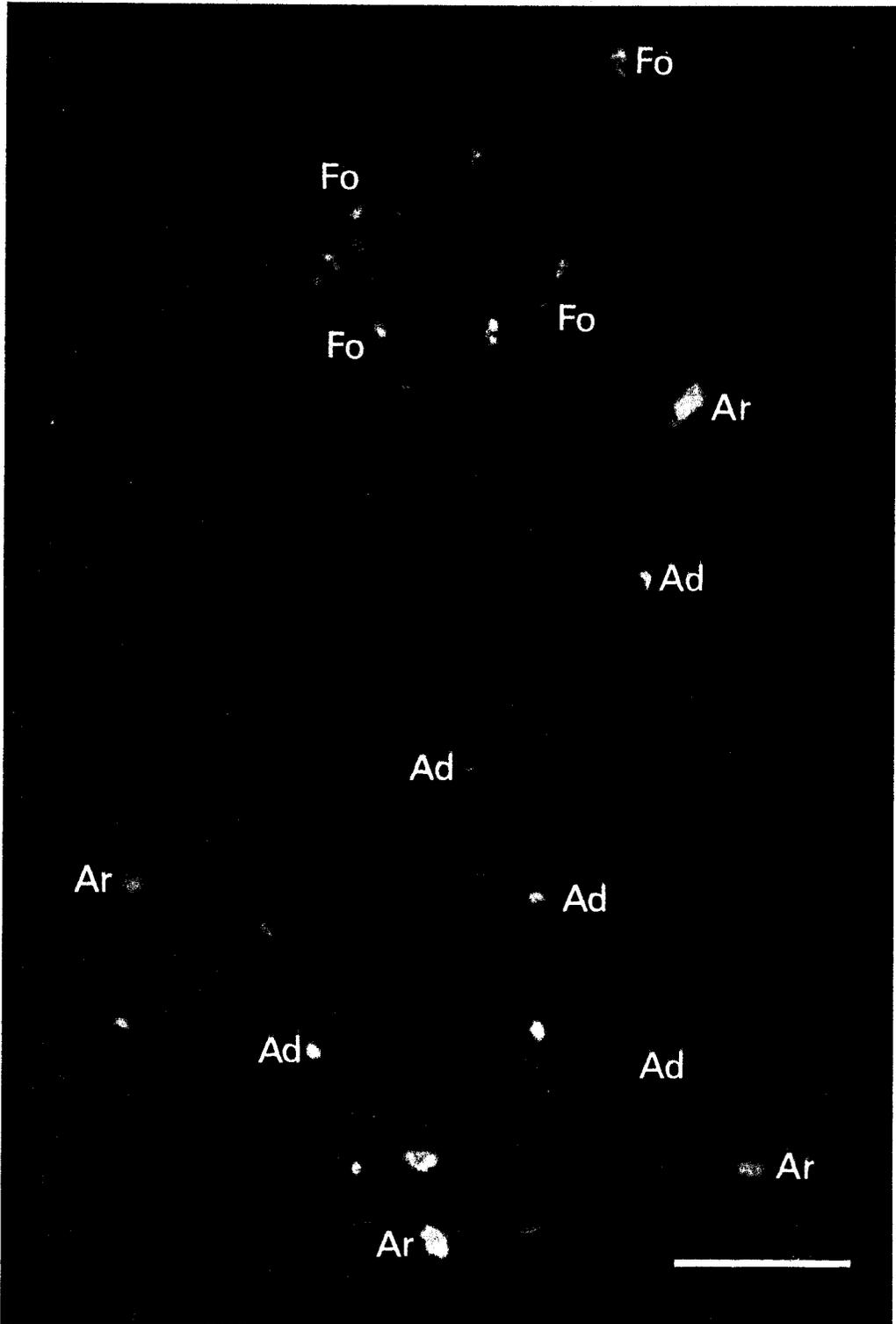


Fig. 26. Diagramas representativos de 4 secciones coronales del bulbo mostrando la localización de los somas marcados de 3 tipos diferentes de neuronas: neuronas propiobulbares que proyectan al GRV caudal (círculos), neuronas bulboespinales que proyectan al núcleo frénico (triángulos) y motoneuronas del núcleo Ambiguo (cuadrados). Las neuronas consideradas que forman parte del GRV están representadas con símbolos rellenos; mientras que aquellas que no se contabilizaron en el presente estudio, se representan con símbolos blancos. Abreviaturas: 12, núcleo hipoglosa; 12n, nervio hipoglosa; FLM, fascículo longitudinal medial; OI, oliva inferior; RO, núcleo del rafe oscuro; RtL, núcleo reticular lateral. Coordenadas como en la figura 20.

Fig. 27. Microfotografía de fluorescencia de neuronas marcadas en el Grupo Respiratorio Ventral rostral en el nivel 1 mm rostral al cero. Abreviaturas: Ad: neuronas propiobulbares marcadas con amarillo diamidino; Ar: neuronas bulboespinales marcadas con azul rápido; Fo: motoneuronas marcadas con fluoro oro. Barra: 100 μ .



Fo

Fo

Fo

Fo

Ar

Ad

Ad

Ar

Ad

Ad

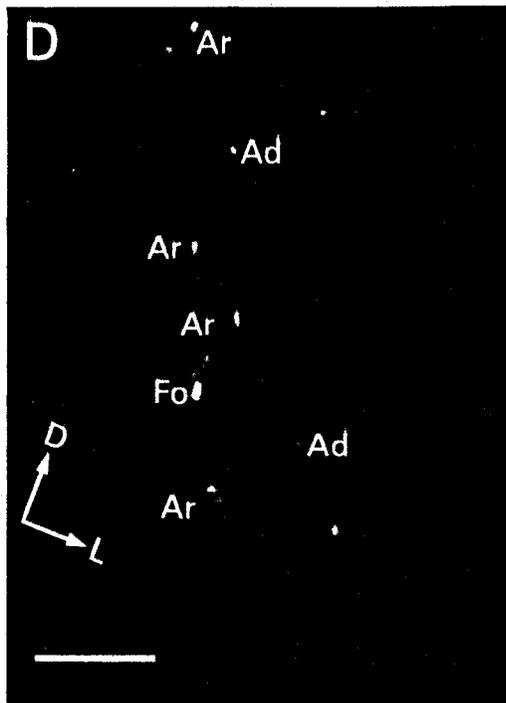
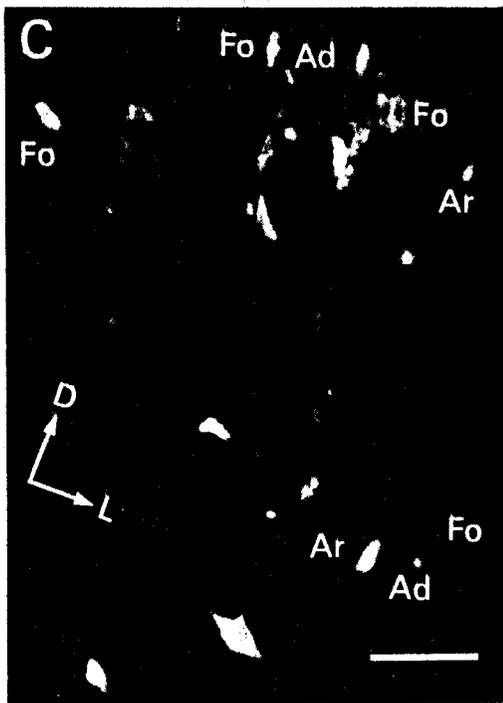
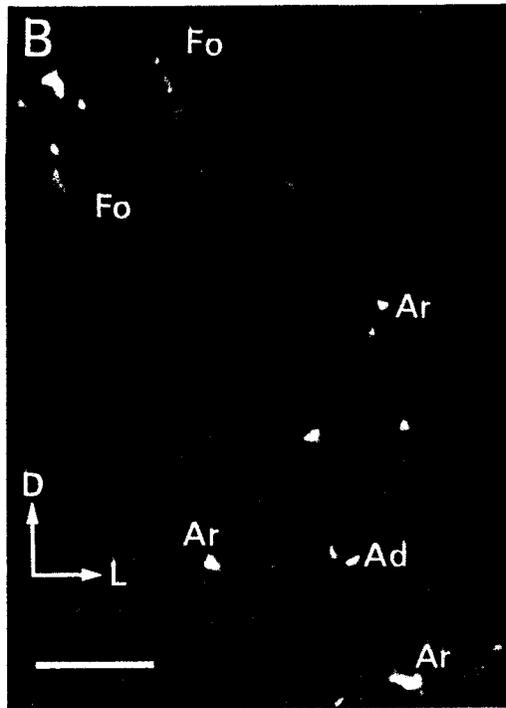
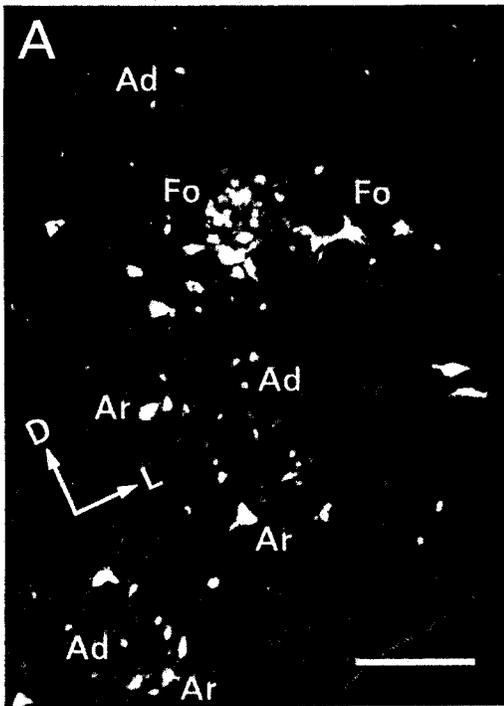
Ad

Ar

Ar



Fig. 28. Microfotografías de fluorescencia de neuronas marcadas en los cuatro niveles representados en la figura 26 (A: 1,5, B: 0,5, C: -0,5 y D: -1,5). Abreviaturas: Ad: neuronas propiobulbares marcadas con amarillo diamidino; Ar: neuronas bulboespinales marcadas con azul rápido; Fo: motoneuronas marcadas con fluoro oro. A y D: Barras, 200 μ . C y B: Barras, 100 μ . D, dorsal; L, lateral.



propiobulbares. En alguna ocasión, algunas motoneuronas se mezclaron con estos dos grupos de neuronas (Figs. 26B, 27 y 28B).

Entre 1 mm y 1,6 mm rostrales al cero se observaron los mayores niveles de apelmazamiento de los somas de las neuronas marcadas. Las neuronas propiobulbares se localizaron muy agrupadas, ventromediales al núcleo Ambiguo en la formación reticular ventrolateral rostral, sin alcanzar los límites del núcleo paragigantocelular. En esta zona, también se encontraron algunas neuronas bulboespinales, preferentemente rodeando a las neuronas propiobulbares. Únicamente unas pocas neuronas marcadas se situaron dorsales al núcleo Ambiguo (Figs. 26A y 28A).

Entre 1,6 y 2,1 mm rostrales al cero las motoneuronas más rostrales del núcleo Ambiguo se dispusieron dorsales al núcleo facial. En esta zona, carente de neuronas bulboespinales, sólo se encontró un pequeño número de neuronas propiobulbares, situadas alrededor de las motoneuronas.

4.3.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES A LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

El principal objetivo de este apartado fue la localización de las neuronas que proyectan específicamente a las principales subdivisiones morfofisiológicas del GRV.

4.3.1.- Localización de las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral

Siguiendo el procedimiento descrito en material y métodos, (apartado 3.2.3) se constataron tres subdivisiones en el GRV, en función de la actividad respiratoria presentada por las neuronas de dichas áreas. Estas tres subdivisiones se localizaron en las siguientes coordenadas: i) entre 2 y 1 mm caudales al cero, la actividad multiunitaria extracelular de las neuronas registradas fue predominantemente espiratoria (Fig. 15F); ii) entre 1 mm caudal al cero y 1 mm rostral al mismo, la actividad multiunitaria extracelular de las neuronas registradas fue predominantemente

inspiratoria (Fig. 15D) y iii) entre 1 y 1,6 mm rostrales al cero, la actividad multiunitaria extracelular de las neuronas registradas en el GRV fue predominantemente espiratoria (Fig. 15B). Para el presente estudio dichas áreas se identificaron como GRV caudal, GRV rostral y Complejo de Bötzing, respectivamente.

4.3.2.- Sitios de inyección

Las inyecciones de azul rápido se realizaron en aquellas zonas del bulbo ventrolateral donde se encontró una mayor amplitud de actividad multiunitaria extracelular, correlacionada con la actividad del diafragma. El marcador difundió sobre un área de 200 a 300 μm de diámetro en las coordenadas rostrocaudales descritas en el apartado anterior, en todas las ocasiones (Fig. 15A, C y E). Los sitios de inyección consistieron en una zona central de intensa fluorescencia, debida al depósito de los cristales de azul rápido, rodeada de una zona periférica con menor intensidad de fluorescencia y con numerosas células de la glia marcadas con azul rápido. Estas inyecciones se localizaron dorsales a la formación reticular lateral, englobando al núcleo Ambiguo; con la excepción de las inyecciones realizadas en el Complejo de Bötzing, que se localizaron ventromediales al mismo (Fig. 5A). Así pues, las inyecciones se colocaron en las áreas de mayor densidad de neuronas propiobulbares y bulboespinales y motoneuronas, ya demostradas en los experimentos anteriores (apartado 4.1.1).

4.3.3.- Conexiones aferentes al Grupo Respiratorio Ventral

Neuronas marcadas con azul rápido se encontraron a todo lo largo del eje rostrocaudal del tronco del encéfalo. Sin embargo, dichas neuronas aparecieron: i) con mayor frecuencia en el lado homolateral al de las inyecciones (el lado derecho); ii) en mayor número tras las inyecciones en el Complejo de Bötzing y GRV rostral que cuando se inyectó el GRV caudal y iii) en mayor densidad en los núcleos y áreas bulbotuberanciales que se citan a continuación.

4.3.3.1.- *Interconexiones entre las subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral*

Las tres subdivisiones del GRV están altamente interconectadas entre sí; ya que tras los tres tipos de inyecciones se encontraron neuronas marcadas a todo lo largo del GRV. Dichas neuronas se localizaron a ambos lados de la línea media, desde una zona que se corresponde con la unión espinobulbar hasta los niveles más rostrales del núcleo Ambiguo (Figs. 29-31). Cuando la inyección se realizó en el Complejo de Bötzingen o en el GRV rostral, las neuronas marcadas en el GRV caudal se distribuyeron muy laxamente formando una columna de células de forma elongada dorsal al núcleo reticular lateral. Esta columna de neuronas se orientó, en el plano coronal en dirección dorsomedial en dirección hacia el núcleo del tracto Solitario pero sin alcanzarlo y en dirección ventrolateral hacia el borde ventral de la superficie bulbar (Figs. 29, 30 y 35D). La población de interneuronas que conectan las distintas subdivisiones del GRV no presentó la misma disposición en los niveles más rostrales del GRV. Tras la inyección en el Complejo de Bötzingen o en el GRV caudal, las neuronas marcadas en el GRV rostral constituyeron un grupo más definido, con una distribución semicompacta (Figs. 35B y C). Por último, las neuronas marcadas en el Complejo de Bötzingen, tras la inyección en el GRV rostral o en el GRV caudal, se encontraron muy delimitadas, en una posición ventral al núcleo Ambiguo (Figs. 30, 31 y 35A). Independientemente de la subdivisión del GRV inyectada, un gran número de neuronas marcadas aparecieron contralaterales a la zona inyectada (Tabla 1).

4.3.3.2.- *Núcleo del tracto Solitario.*

Un gran número de neuronas marcadas retrógradamente con azul rápido apareció en los distintos subnúcleos del tracto Solitario tras cualquiera de las diferentes inyecciones realizadas en el GRV. Las neuronas marcadas se extendieron desde 1,5 mm caudales al cero, en el subnúcleo comisural, hasta 1 mm rostral al cero, en el subnúcleo dorsomedial. No obstante, no se encontraron neuronas marcadas en el tercio rostral del núcleo del tracto Solitario, desde 1 a 2 mm rostrales al cero. En todos los casos, el número de células marcadas fue siempre mayor en el lado homolateral al de las

Fig. 29.- Diagramas representativos de secciones coronales bulbotuberanciales mostrando la localización de los somas de las neuronas marcadas (puntos) tras la inyección de azul rápido en el Complejo de Bötzing (flecha). Cada punto representa dos células marcadas en una sección de 50 μ de grosor. Coordenadas: distancia en mm respecto del borde rostral del área postrema, tomado como cero; +, rostral; -, caudal. Abreviaturas: 7n, nervio facial; 12n, nervio hipogloso; Amb, núcleo Ambiguo; cu, fascículo cuneado; gr, fascículo grácil; pd, haz predorsal; sol, tracto Solitario.

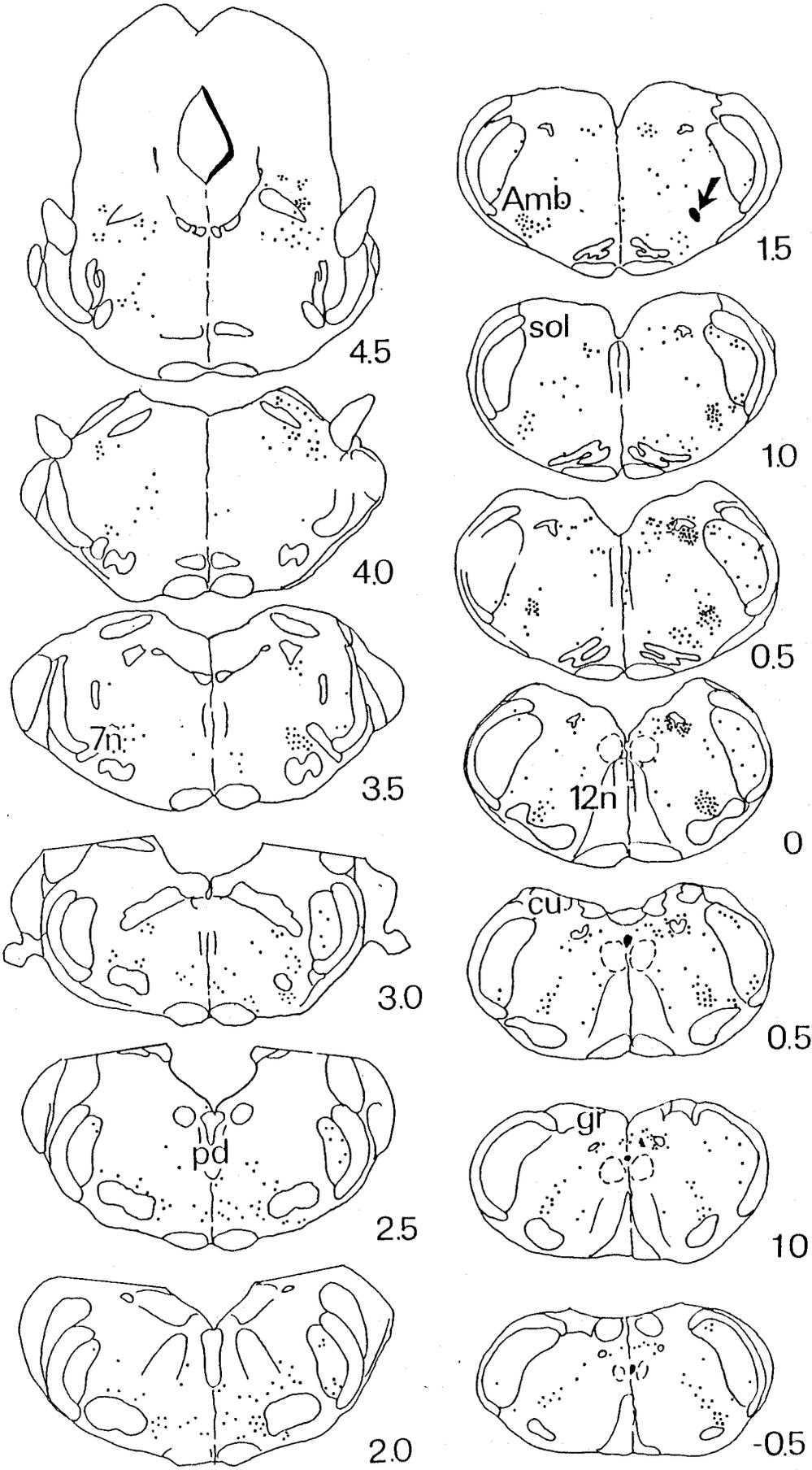


Fig. 30.- Diagramas representativos de secciones coronales bulboprotuberanciales mostrando la localización de los somas de las neuronas marcadas (puntos) tras la inyección de azul rápido en el GRV rostral (flecha). Coordenadas, abreviaturas y representación neuronal como en la figura 29.

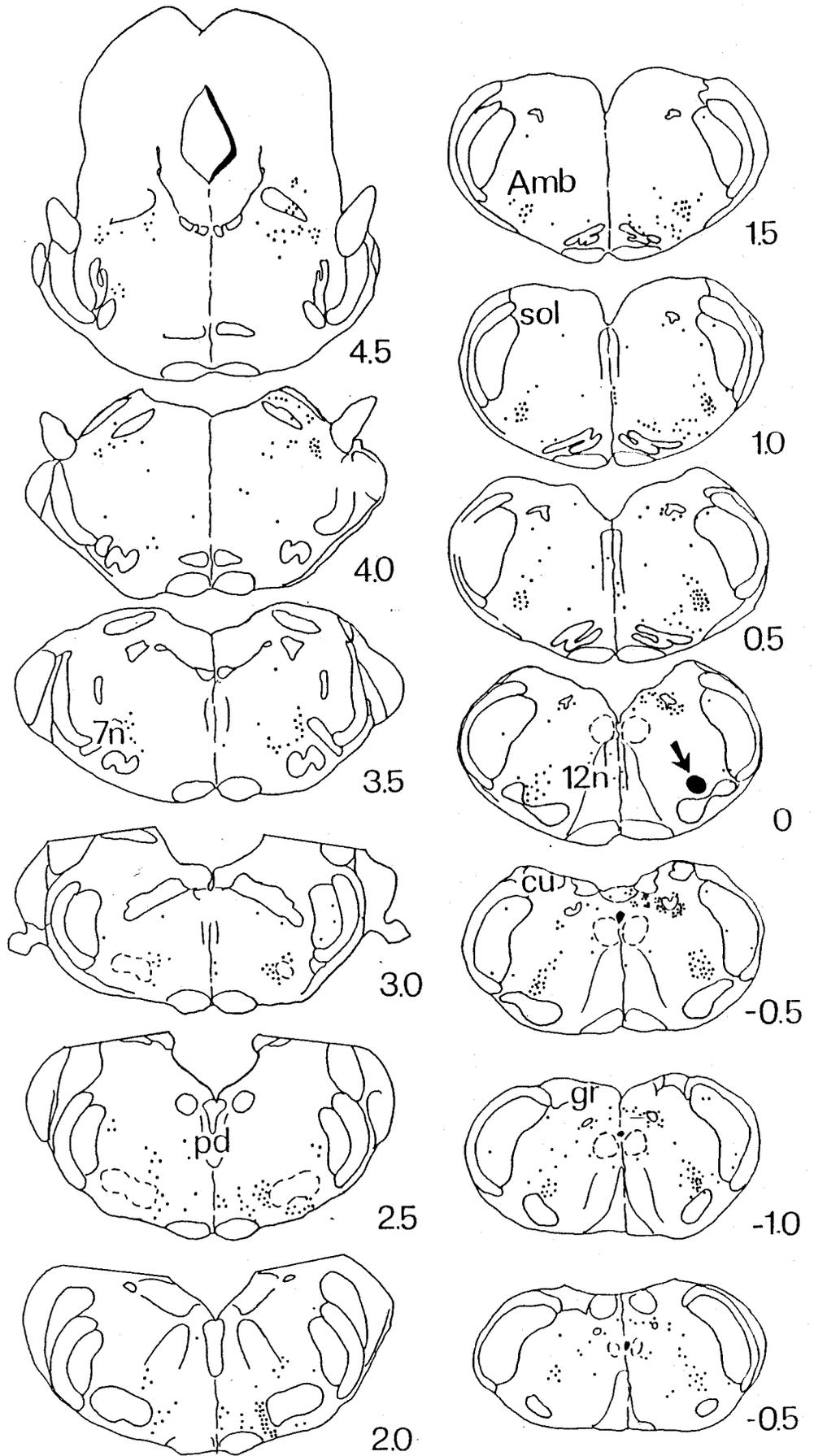
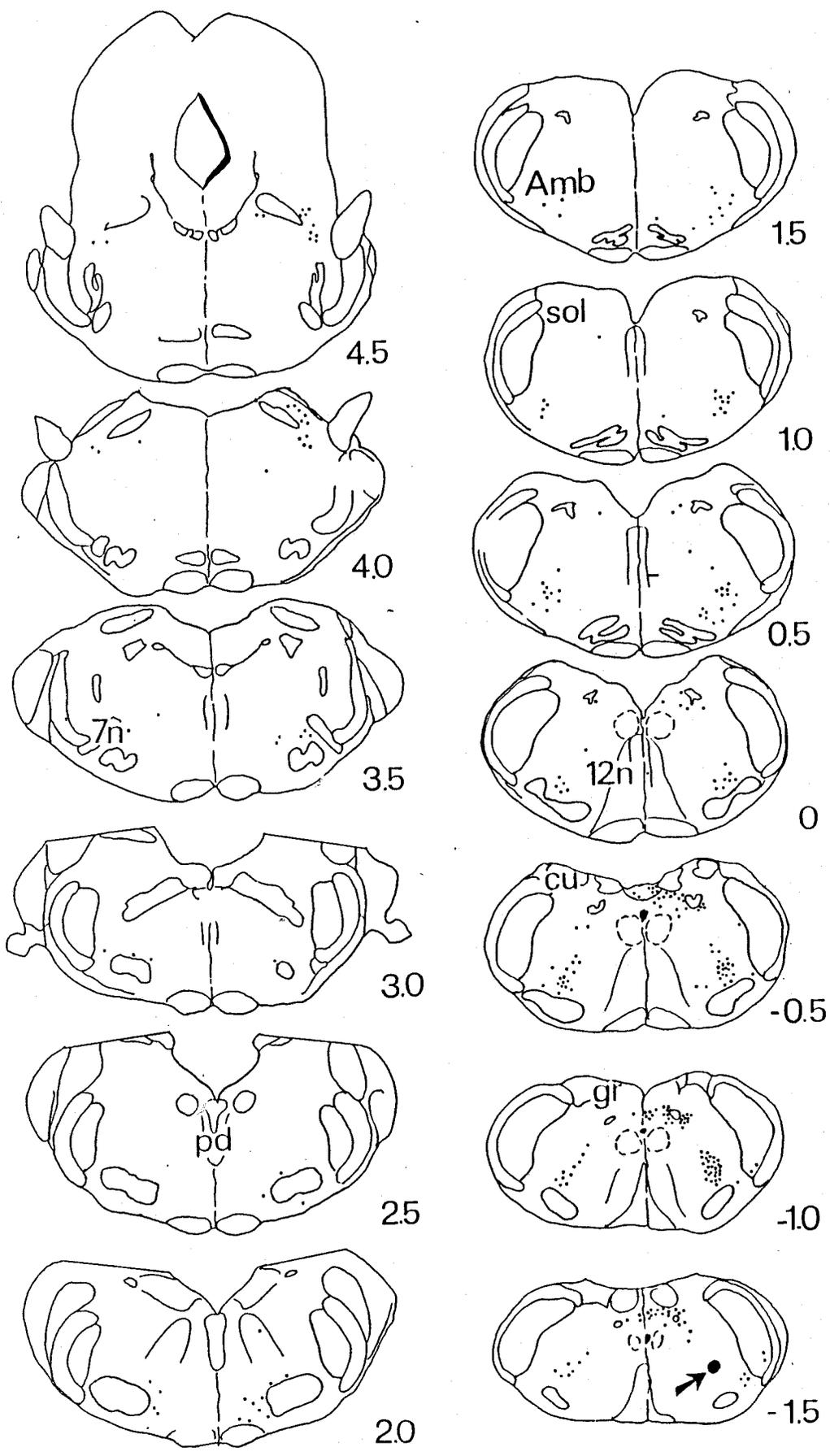


Fig. 31.- Diagramas representativos de secciones coronales bulboprotuberanciales mostrando la localización de los somas de las neuronas marcadas (puntos) tras la inyección de azul rápido en el GRV caudal (flecha). Coordenadas, abreviaturas y representación neuronal como en la figura 29.



inyecciones (Figs. 29-31, Tabla 1). La mayor densidad de marcaje neuronal se encontró en los subnúcleos del tracto Solitario relacionados con la función respiratoria (Herbert y col., 1990), tales como el ventrolateral, intermedio y comisural (Tabla 1). Sin embargo, los subnúcleos de la parte visceral del tracto Solitario mostraron un número muy pequeño de neuronas marcadas (Tabla 1). Sólo se encontraron algunas neuronas en el subnúcleo dorsomedial, aunque su número fue mayor tras la inyección del fluorocromo en el GRV rostral (Fig. 33), y muy pocas neuronas se hallaron en los subnúcleos medial, parvocelular y gelatinoso (Figs. 32-34 y 36D-E). El subnúcleo central del tracto Solitario apareció fuertemente marcado sólo cuando el área de difusión de la inyección de azul rápido, centrada en el Complejo de Bötzing, alcanzó la porción más rostral del núcleo Ambiguo (Fig. 18). Por otra parte, este subnúcleo no presentó neuronas marcadas cuando la difusión de la inyección fue pequeña y ésta se situó ventral al núcleo Ambiguo, sin afectarlo.

Se observó una clara distribución topográfica de las neuronas marcadas que proyectan a cada una de las tres subdivisiones del GRV. Así pues, las neuronas que proyectan a la división más caudal del GRV (GRV caudal) se situaron más caudales en los distintos subnúcleos del tracto Solitario y aquellas que proyectan a las subdivisiones más rostrales del GRV se situaron, así mismo, más rostrales en dichos subnúcleos. Esta distribución topográfica fue aún más acusada en los subnúcleos ventrolateral e intermedial del tracto Solitario (Tabla 1).

En el área postrema homolateral a la inyección se encontraron neuronas marcadas, agrupadas en su zona periférica; es decir, en las zonas colindantes con los subnúcleos comisural, parvicelular y dorsomedial del tracto Solitario. Sin embargo, el número de neuronas marcadas varió considerablemente en función del tipo de inyección; ya que no aparecieron neuronas marcadas tras la inyección en el Complejo de Bötzing (Fig. 32) y sí un alto número de ellas tras la inyección en el GRV caudal (Figs. 33, 34 y 36D).

TABLA 1

Resumen de los resultados cuantitativos obtenidos tras los tres tipos de inyecciones con azul rápido en el Grupo Respiratorio Ventral

Núcleos con neuronas marcadas	CB		GRV rostral		GRV caudal	
	h	c	h	c	h	c
CB	inj	+++	+++	++	++	+
GRV rostral	+++	++	inj	+++	+++	++
GRV caudal	+++	++	++	+	inj	++
Tracto Solitario						
ventrolateral	++	-	+++	+	++	+/-
intermedio	+++	-	+++	+	++	+/-
central	+/-	-	-	-	-	-
medial	+	+/-	+	-	+/-	-
gelatinoso	+/-	-	+	-	+/-	-
dorsomedial	+	+/-	++	-	+	-
comisural	+	+/-	++	+	++	+
parvocelular	+/-	-	+/-	-	+/-	-
Area postrema	-	-	++	+	+++	+
Parabraquial						
medial	+++	+	++	+	++	+
externolateral	+/-	-	+/-	-	+/-	-
centrolateral	+++	+	++	+/-	+	-
ventrolateral	+/-	-	+/-	-	-	-
dorsal	+	-	++	-	+	-
Kölliker-Fuse	+++	++	++++	++	+++	+
Paragigantocelular lateral						
rostral	++	+	+++	++	+	+
caudal	++	+/-	++	+/-	+	-
Retrotrapezoide	+	-	++	-	+/-	-
Tegmental lateral						
periférico del facial	++	+	+	+/-	+	+/-
A5	+++	+	++	+	+	+/-
Tegmental magnocelular						
rostral	++	+	++	+/-	+/-	-
caudal	+/-	-	+	+/-	+/-	-
Rafe magno	+	+/-	+	-	-	-
Rafe oscuro	+	+/-	+	+/-	+/-	-
Trigémino espinal						
rostral	+	+/-	+/-	-	-	-
intercalado	+	+/-	+	+/-	+	-
caudal	-	-	-	-	+/-	-

Las neuronas se contaron en secciones de 50 μ ; -, ninguna neurona; +/-, escasas neuronas en algún experimento o en alguna sección; +, 1-5 neuronas; ++, 6-15 neuronas; +++, 16-30 neuronas; 31-50 neuronas; h, homolateral; c, contralateral; CB, Complejo de Bötzing; GRV, Grupo Respiratorio Ventral.

4.3.3.3.- Núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse

Se encontraron neuronas marcadas a todo lo largo del eje rostrocaudal, a ambos lados de la línea media, en los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse y en diversos subnúcleos del parabraquial lateral (Tabla 1). Sin embargo, en los niveles más caudales de los núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse, el marcaje neuronal homolateral fue más intenso que el hallado en los niveles más rostrales de dichos núcleos.

Cuando se inyectó, con azul rápido, el GRV rostral o el GRV caudal, las neuronas marcadas en el núcleo parabraquial medial se localizaron exclusivamente en los bordes laterales y ventrolaterales del mismo (Figs. 33, 34 y 36A). Sin embargo, cuando la inyección de fluorocromo se centró en el Complejo de Böttinger se observó un mayor número de neuronas marcadas que en el caso anterior y en una zona más amplia del núcleo parabraquial, incluyendo posiciones más mediales y más rostrales a las previamente descritas.

Diversos subnúcleos del parabraquial lateral presentaron neuronas marcadas tras las inyecciones del trazador en el GRV (Tabla 1), con una distribución similar para los tres tipos de inyecciones. Las células marcadas se organizaron en una columna que, arrancando desde el borde dorsal del núcleo de Kölliker-Fuse, rodeó el subnúcleo externo lateral hasta alcanzar los subnúcleos central lateral y dorsal lateral del mismo. Sin embargo, la densidad celular fue ligeramente distinta tras la inyección del fluorocromo en el Complejo de Böttinger; ya que las células encontradas en el subnúcleo central lateral se agruparon de forma diferente a las otras dos series experimentales (Fig. 32).

La mayor densidad de marcaje neuronal dentro del núcleo de Kölliker-Fuse se encontró tras la inyección del trazador en el GRV rostral y la menor densidad tras la inyección en el Complejo de Böttinger. No obstante, si se subdivide el núcleo de Kölliker-Fuse en tres áreas a lo largo del eje rostrocaudal, la gran mayoría de las neuronas marcadas se hallaron en la zona intermedia de dicho núcleo (Figs. 32-34).

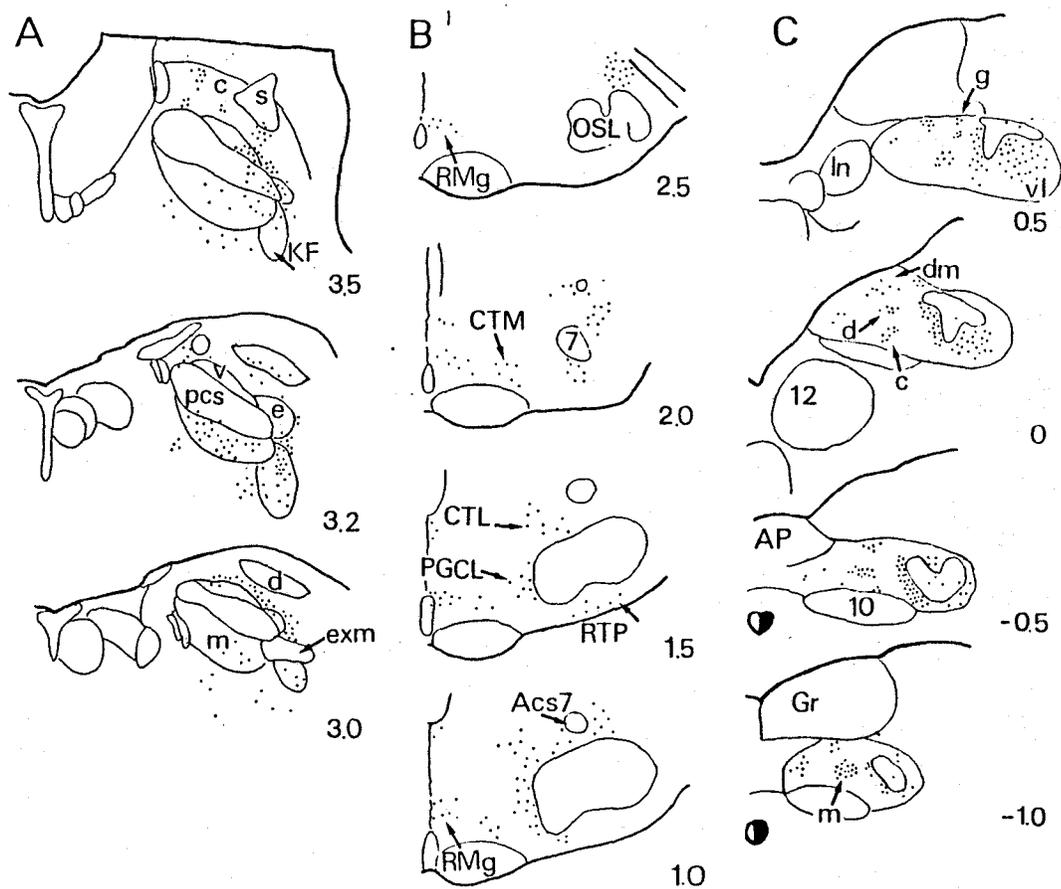


Fig. 32.- Distribución de los somas de las neuronas marcadas con azul rápido tras la inyección del marcador en el Complejo de Böttinger. Cada punto representa una neurona marcada en una sección de $50\ \mu$ de grosor A: Secciones coronales a nivel de la protuberancia, mostrando la localización de las neuronas en los núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse (KF). B: Diagramas de secciones coronales del bulbo ventrolateral mostrando las neuronas marcadas en los núcleos paraventricular lateral (PGCL) y retrotrapezoide (RTP). C: Diagramas de secciones coronales del bulbo dorsal mostrando la localización de las neuronas marcadas en los distintos subnúcleos del tracto Solitario. Coordenadas: distancia en mm respecto del cero. Abreviaturas: 10, núcleo motor dorsal del vago; 12, núcleo hipogloso; c, s, v, e, d y exm subnúcleos central, superior, ventral, externo, dorsal y externo medial del parabraquial lateral, respectivamente; m, núcleo parabraquial medial; g, vl, dm, d, c y m, subnúcleos gelatinoso, ventrolateral, dorsomedial, dorsal, central y medial del núcleo del tracto Solitario, respectivamente; Acs7, núcleo accesorio del facial; AP, área postrema; CTL, campo tegmental lateral; CTM, campo tegmental magnocelular; Gr, núcleo grácil; In, núcleo intercalar; OSL, oliva superior lateral; pcs, pedúnculo cerebeloso superior; RMg, núcleo del rafe magno.

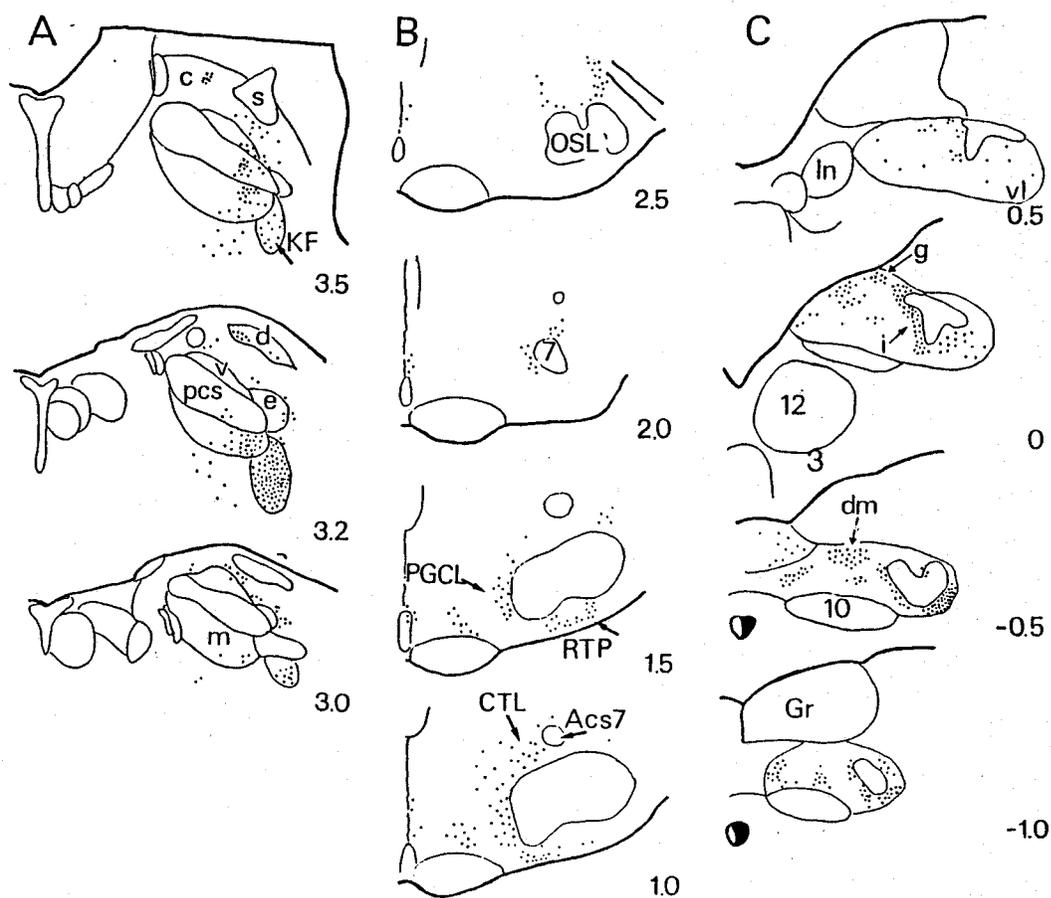


Fig. 33.- Distribución de los somas de las neuronas marcadas con azul rápido tras la inyección del marcador en el GRV rostral. Diagramas, coordenadas y representación neuronal como en la figura 32. Abreviaturas: i, subnúcleo intermedio del tracto Solitario; las demás como en la figura 32.

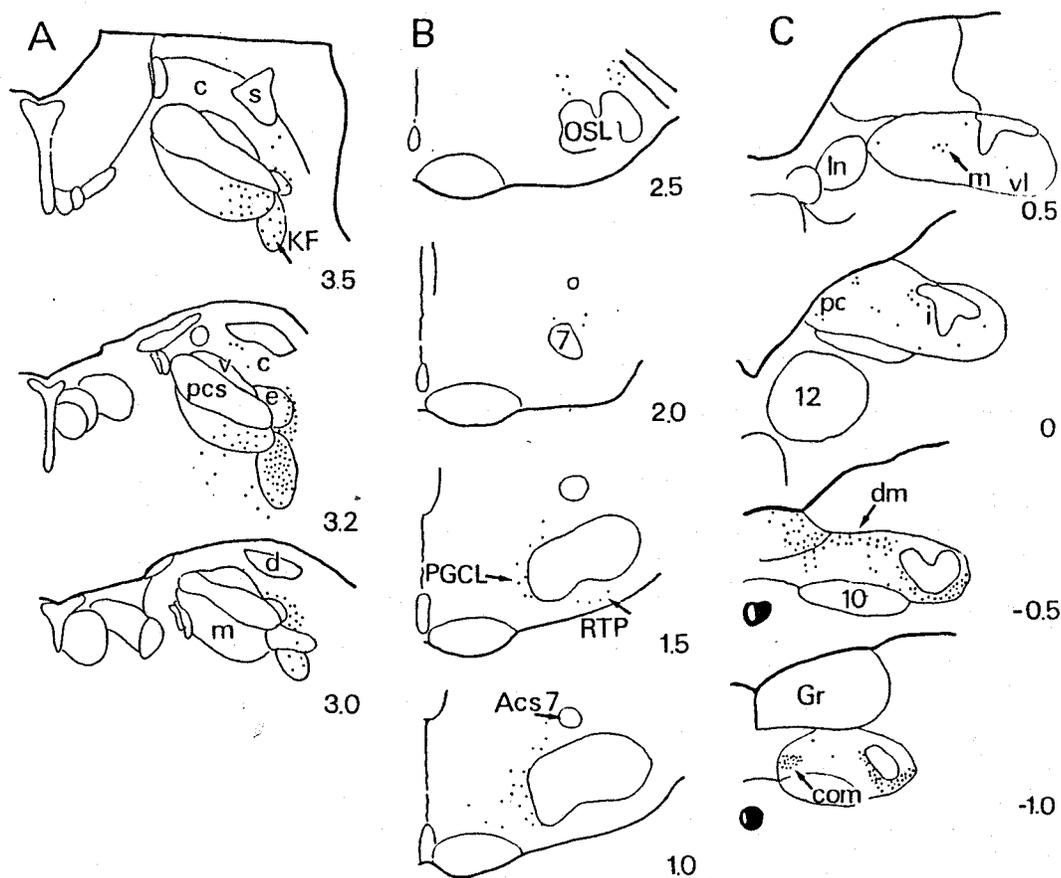


Fig. 34.- Distribución de los somas de las neuronas marcadas con azul rápido tras la inyección del marcador en el GRV caudal. Diagramas, coordenadas y representación neuronal como en la figura 32. Abreviaturas: pc y com, subnúcleos parvocelular y comisural del tracto Solitario, respectivamente; los demás como en la figura 32.

Se observó una ligera distribución topográfica de las neuronas marcadas que proyectan desde los núcleos pontinos a cada una de las tres subdivisiones del GRV. Así, las neuronas que proyectaron a la división más caudal del GRV (GRV caudal) se situaron más caudales dentro de los distintos subnúcleos del parabraquial medial y del Kölliker-Fuse (Tabla 1).

Tras las inyecciones en el Complejo de Bötzing y GRV rostral se localizó una columna de neuronas marcadas dorsolateralmente al núcleo parabraquial medial, en su porción más rostral. Esta columna de células se extendió al borde ventrolateral del subnúcleo central lateral, cruzando los pedúnculos cerebelosos superiores. Así mismo, se encontró un grupo de células marcadas en el núcleo subcerúleo dorsal, justo medialmente al núcleo de Kölliker-Fuse y ventral al núcleo parabraquial medial, tras las inyecciones en cualquiera de los subgrupos del GRV.

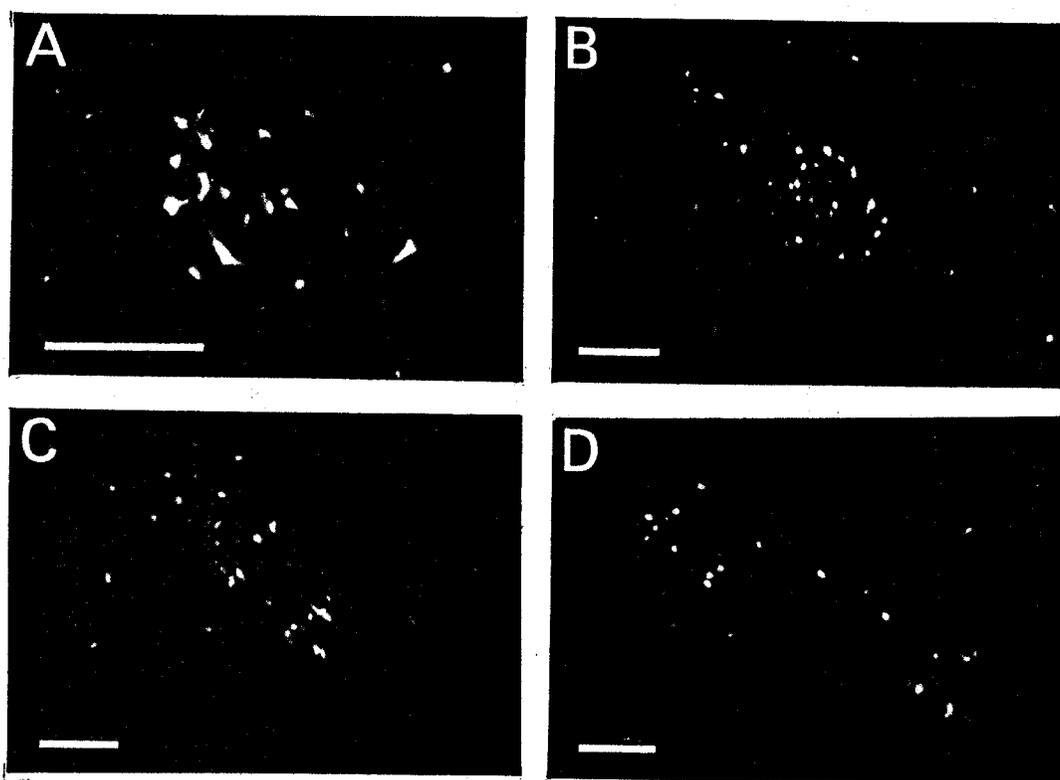
4.3.3.4.- *Núcleo paragigantocelular lateral*

El núcleo paragigantocelular lateral presentó neuronas marcadas con azul rápido a ambos lados de la línea media, en sus dos subdivisiones caudal y rostral, en las tres series experimentales. Los somas localizados en la parte caudal del núcleo se dispusieron justo mediales y ventromediales al Complejo de Bötzing. Las neuronas marcadas presentaron un elevado porcentaje de proyección homolateral (Tabla 1 y Figs. 32-34). En el nivel rostral del núcleo paragigantocelular lateral las neuronas marcadas se dispusieron mediales al núcleo facial, aunque en número similar en el lado contralateral y homolateral. Si bien se observó una gran similitud respecto a la localización y distribución de las neuronas marcadas tras los tres tipos de inyecciones de fluorocromos, éstas fueron más numerosas en el experimento de inyecciones en el GRV rostral (Figs. 32-34 y 36B).

4.3.3.5.- *Campo tegmental lateral*

En el campo tegmental lateral de la protuberancia aparecieron células marcadas a ambos lados de la línea media, aunque en mayor

Fig. 35.- Microfotografías de fluorescencia de células marcadas con azul rápido, tras la inyección del fluorocromo en el Complejo de Bötzing, de cuatro niveles representativos del bulbo ventrolateral. A: Representa el nivel más rostral del GRV, Complejo de Bötzing. D: Representa el nivel más caudal del GRV, GRV caudal. B y C: Niveles intermedios del GRV rostral. Barras: 150 μ .



densidad en el lado homolateral, tras las diferentes inyecciones en el GRV. Estas neuronas marcadas se ubicaron preferentemente en dos áreas: i) dorsalmente al núcleo facial, algunas de ellas formando una columna celular continua con las neuronas marcadas localizadas en el núcleo paragigantocelular lateral rostral y ii) dorsalmente al núcleo de la oliva superior y mediales al nervio facial, en una zona cercana al núcleo reticular intermedio (Tabla 1, Figs. 32-34 y 36B). En ambas áreas se encontraron neuronas marcadas en las tres series experimentales, aunque en mayor número tras la inyección en el Complejo de Bötzingher.

4.3.3.6.- *Núcleo retrotrapezoide*

El núcleo retrotrapezoide lo constituye un pequeño grupo de células, localizadas ventralmente al núcleo facial y lateralmente a la subdivisión rostral del núcleo paragigantocelular lateral y limitado rostralmente por el borde caudal del núcleo de la oliva superior (Smith y col., 1989). Este núcleo apareció densamente marcado tras las inyecciones de fluorocromo en el GRV rostral y Complejo de Bötzingher (Figs. 32-34 y 36B-C) y, en menor medida, tras la inyección en el GRV caudal. Las proyecciones desde este núcleo a cualquiera de las tres subdivisiones del GRV fueron exclusivamente homolaterales (Figs. 29-31).

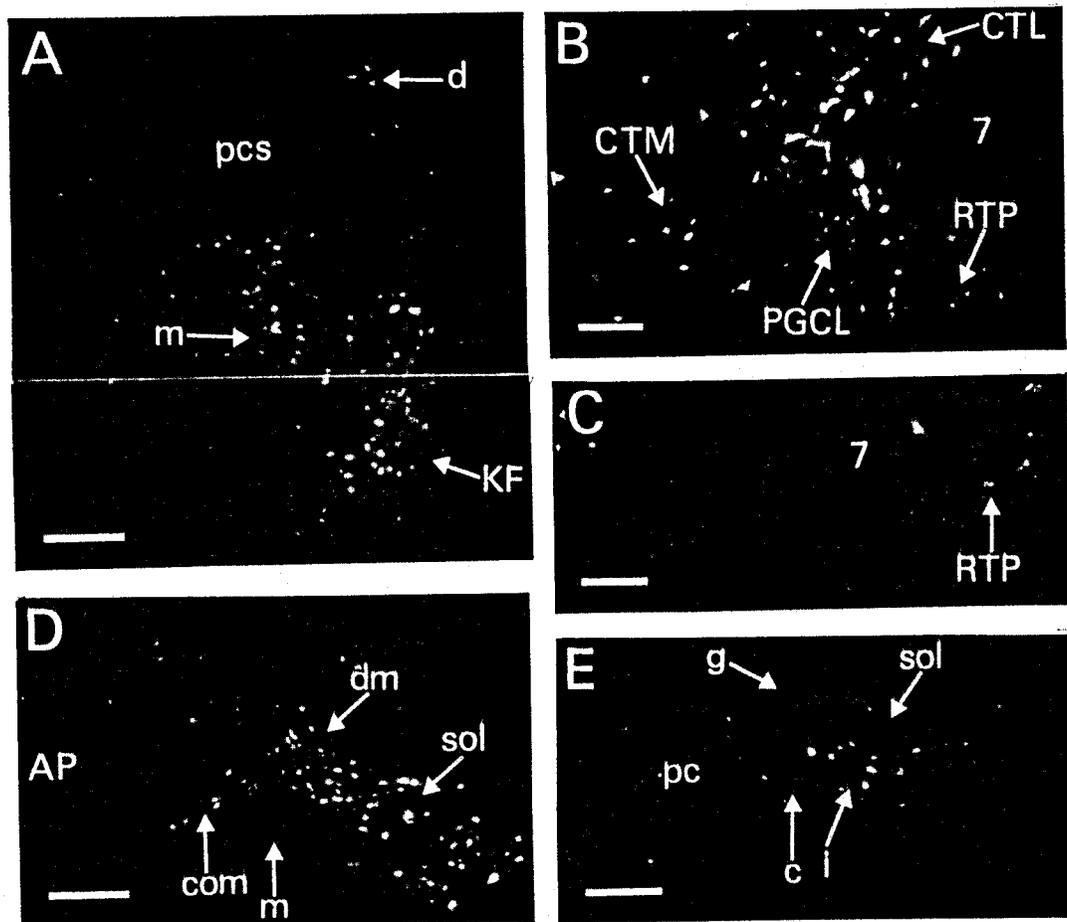
4.3.3.7.- *Campo tegmental magnocelular*

En el campo tegmental magnocelular se observaron neuronas marcadas con azul rápido, tanto en su división caudal como en la rostral, con predominancia de las proyecciones homolaterales (Figs. 32-34; Tabla 1). El mayor número de células marcadas se encontró en la subdivisión rostral, tras las inyecciones de azul rápido en el Complejo de Bötzingher y GRV rostral (Figs. 32, 33 y 36B).

4.3.3.8.- *Núcleos del rafe*

Tras los tres tipos de inyecciones en el GRV se localizaron neuronas marcadas en el lado homolateral del núcleo del rafe oscuro

Fig. 36.- Microfotografías de fluorescencia de células marcadas con azul rápido de diferentes niveles representativos del tronco del encéfalo. A: Neuronas marcadas en los núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse (KF) tras la inyección del fluorocromo en el GRV rostral. B-C: Neuronas marcadas en los núcleos paragigantocelular lateral (PGCL) y retrotrapezoide (RTP) tras la inyección del marcador en el GRV rostral. D y E: Neuronas marcadas en los distintos subnúcleos del tracto Solitario y área postrema (AP) tras la inyección de azul rápido en el GRV caudal. Abreviaturas: como en la figura 32.



(Tabla 1, Figs. 29-31). Así mismo, se observaron neuronas marcadas en el lado homolateral del núcleo del rafe magno, ventromediales a las encontradas en la subdivisión rostral del campo tegmental magnocelular; pero sólo cuando se inyectó el fluorocromo en el Complejo de Bötzingen o en el GRV rostral (Figs. 29 y 30).

4.3.3.9.- *Núcleo trigémino espinal*

El núcleo trigémino espinal apareció escasamente marcado tras las diferentes inyecciones realizadas en el GRV, la mayor parte de las neuronas marcadas situadas en el lado homolateral (Figs. 29-31). La distribución de dichas neuronas fue diferente en función del experimento realizado. Las subdivisiones intercalar y oral del núcleo trigémino espinal se marcaron tras la inyección del fluorocromo en el Complejo de Bötzingen (Fig. 29); las subdivisiones caudal e intercalar presentaron neuronas marcadas tras la inyección de azul rápido en el GRV rostral (Fig. 30) y sólo y exclusivamente se observaron neuronas marcadas en la subdivisión caudal tras la inyección del trazador en el GRV caudal (Fig. 31).

4.3.3.10.- *Otros núcleos*

Muy pocas células marcadas se observaron en los núcleos siguientes: i) reticular parvocelular y reticular gigantocelular tras las inyecciones del fluorocromo en el Complejo de Bötzingen; ii) subdivisión caudal del reticular pontino, exclusivamente en el lado contralateral, tras la inyección del trazador en el Complejo de Bötzingen y GRV rostral. Algunas de las neuronas marcadas se localizaron en el borde del núcleo subcerúleo, división ventral; iii) subdivisiones dorsal y ventral de los núcleos reticulares medulares tras las tres series experimentales y iv) borde ventrolateral de la porción más caudal del núcleo hipogloso tras las inyecciones en el GRV rostral.

4.4.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES BILATERALES A LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

El principal objetivo de este apartado fue localizar qué neuronas, de las descritas en el experimento anterior, proyectan a cada una de las principales subdivisiones fisiológicas del GRV de ambos hemibulbos, mediante colaterales axónicas.

4.4.1.- Sitios de inyección

Tanto las inyecciones de azul verdadero como las inyecciones de amarillo diamidino se localizaron en coordenadas similares a las descritas en el experimento anterior, en aquellas zonas que se corresponden con las tres subdivisiones del GRV determinadas previamente.

Los sitios de inyección del marcador amarillo diamidino mostraron tres zonas concéntricas alrededor del tracto realizado con el microelectrodo, ya descritas por Condé (1987): i) zona 0, área del tejido dañada; ii) zona 1, área con alta fluorescencia debido a la presencia de cristales del marcador fluorescente; y iii) zona 2, área con baja fluorescencia y alto número de células de la glía marcadas con el marcador fluorescente (Fig. 17).

Los sitios de inyección del marcador azul verdadero mostraron unas áreas de difusión (áreas 1 y 2) mayores que las del marcador amarillo diamidino (Fig. 17A). El tamaño de dichas inyecciones varió entre 218 y 312 μm para el azul verdadero y entre 187 y 250 μm para el amarillo diamidino. A pesar de estas diferencias, no se observó que el número, la distribución o el patrón de marcaje homolateral o contralateral de cada una de las proyecciones al GRV de las neuronas marcadas con azul verdadero fuera distinto al de las inyecciones de amarillo diamidino (Tabla 2).

Neuronas doblemente marcadas se encontraron, en porcentaje similar, en los núcleos del tronco del encéfalo del lado izquierdo o del lado derecho (51% y 49%, respectivamente). Este dato señala que las propiedades de transporte axonal retrógrado y marcaje neuronal son muy semejantes para ambos marcadores. Las neuronas

TABLA 2

Resumen de los resultados cuantitativos obtenidos tras la inyección bilateral con amarillo diamidino y azul rápido, respectivamente, en las tres subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral.

Núcleo inyectado	Fluoro- cromo	número de neuronas marcadas										Media y rango
		GRVc		GRVr		CB		Solv1		PBM/KF		
		h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	
CB	ad	47	16	65	7	-	-	71	6	92	18	322 (304-349)
	av	121	8	70	7	-	-	71	9	142	52	510 (480-672)
GRVr	ad	96	29	-	-	9	7	37	5	17	6	206 (108-305)
	av	89	38	-	-	27	13	64	4	38	13	286 (97-277)
GRVc	ad	-	-	32	9	9	4	24	5	15	8	106 (69-177)
	av	-	-	24	7	16	2	26	6	7	6	94 (71-158)

Abreviaturas: GRVc, GRV caudal; GRVr, GRV rostral; CB, Complejo de Bötzing; Solv1, subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario; PBM/KF, región de los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse; ad, amarillo diamidino; h, homolateral; c, contralateral; av, azul verdadero.

doblemente marcadas (los núcleos marcados en amarillo y los somas y dendritas en azul brillante) se localizaron en numerosos núcleos troncoencefálicos. Las neuronas marcadas en los núcleos paragigantocelular lateral, división rostral; campo tegmental lateral; campo tegmental magnocelular; núcleo reticular medular dorsal; núcleo reticular medular ventral y núcleo subcerúleo constituyeron unos porcentajes inferiores al 0.5% del total de las neuronas marcadas en dichas áreas y solo se obtuvieron en algunos experimentos concretos. Estos datos no se citaran a continuación, ya que no se contabilizaron para los resultados experimentales presentes.

4.4.2.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Complejo de Bötzinger

Neuronas doblemente marcadas, en gran número, se localizaron en los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse (Fig. 38D) y en el GRV rostral (Figs. 37 y 38C). Estas neuronas doblemente marcadas representaron un 2% del total de las neuronas marcadas con cualquiera de los dos fluorescentes empleados. Sin embargo, las neuronas encontradas en el GRV rostral se agruparon preferentemente en los niveles desde 0,7 a 1 mm rostrales al cero y desde 0,4 mm caudal al cero hasta el propio cero. Si sólo se tiene en cuenta las neuronas marcadas en estas dos secciones del GRV rostral, los neuronas doblemente marcadas constituyeron un 10% del total. También apareció un reducido número de neuronas doblemente marcadas en el GRV caudal, en alguno de los experimentos realizados (Fig. 38A).

4.4.3.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral rostral

El Complejo de Bötzinger fue el área que presentó una mayor densidad de neuronas doblemente marcadas proyectando a ambos GRV rostral (Fig. 39D). Estas constituyeron un 3% del total de las neuronas marcadas en dicha área. Algunas neuronas doblemente marcadas aparecieron en los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, pero en menor número y en menor proporción (1% del

Fig. 37.- Microfotografía de fluorescencia de células marcadas en el GRV rostral tras la inyección bilateral de azul verdadero (av) y amarillo diamidino (ad) en el Complejo de Böttinger. La neurona doblemente marcada (flecha) presenta marcados el núcleo con Ad y el soma y las dendritas principales con Av. Abreviaturas: Amb, núcleo Ambiguo.

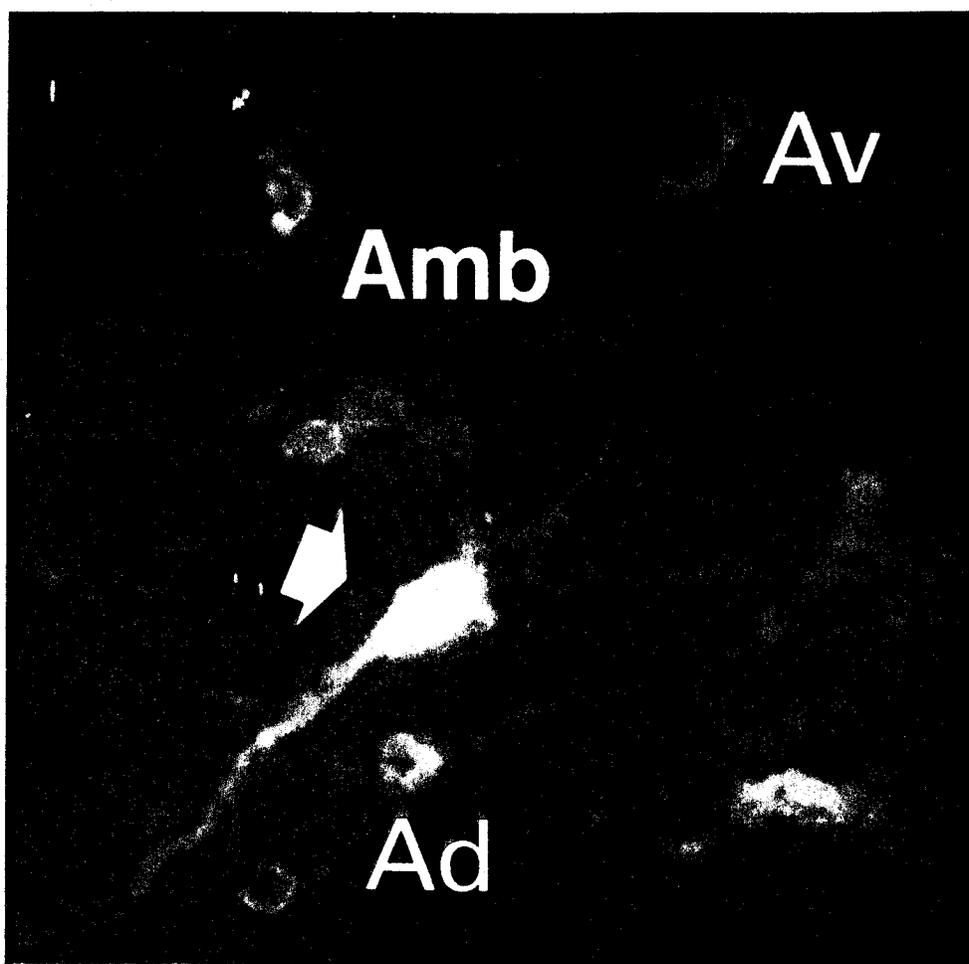


Fig. 38.- Microfotografías de fluorescencia de células marcadas en diferentes núcleos bulboprotuberanciales tras la inyección de azul verdadero (av) en la izquierda y amarillo diamidino (ad) en la derecha del bulbo ventrolateral. A: Neuronas marcadas con av y ad en el GRV caudal tras inyecciones en el Complejo de Bötzing (CB). B: Neuronas marcadas con av y ad en el GRV rostral tras inyecciones bilaterales en el GRV caudal. C: Neurona doblemente marcada (flecha) en el GRV rostral tras inyecciones bilaterales en el CB. Barras: 75 μ . D: Neuronas marcadas con av y ad en los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse tras la inyección en ambos CB. Barra: 150 μ . Abreviaturas: pcs, pedúnculo cerebeloso superior.

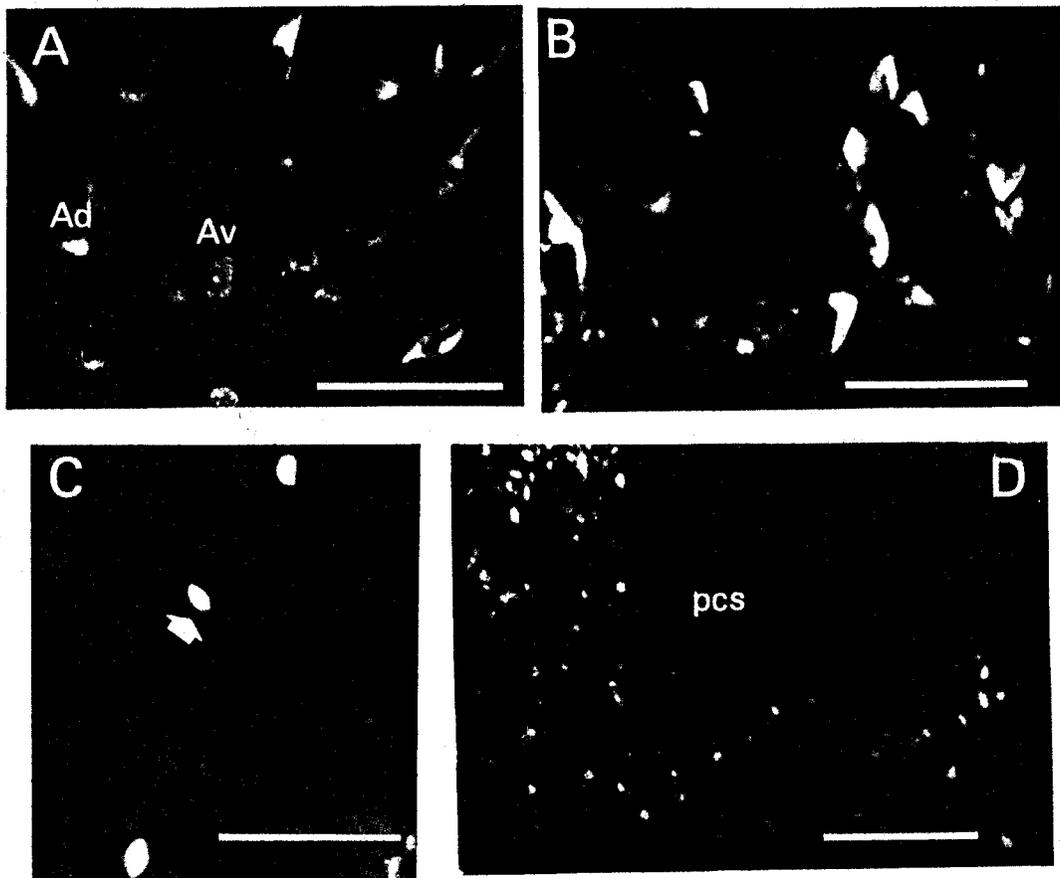
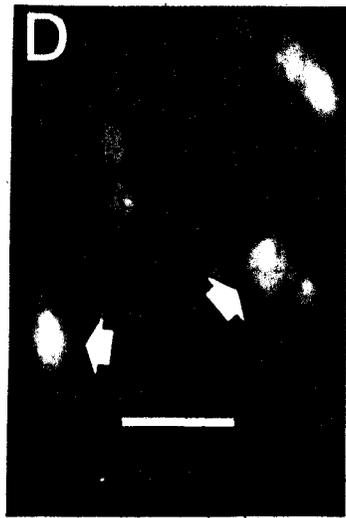
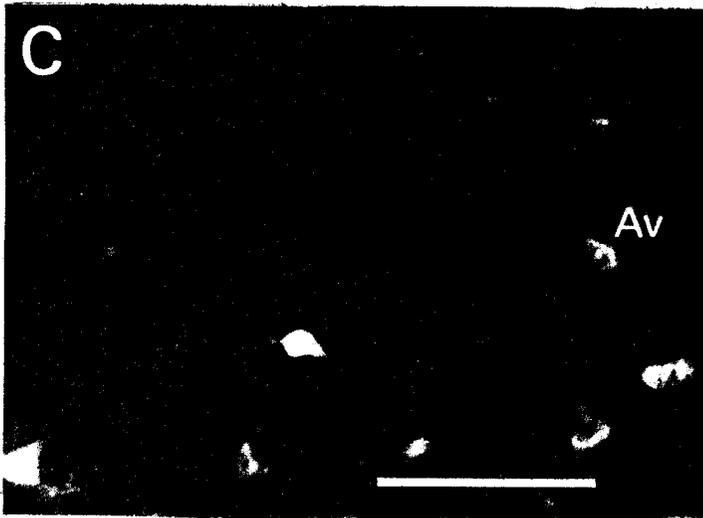
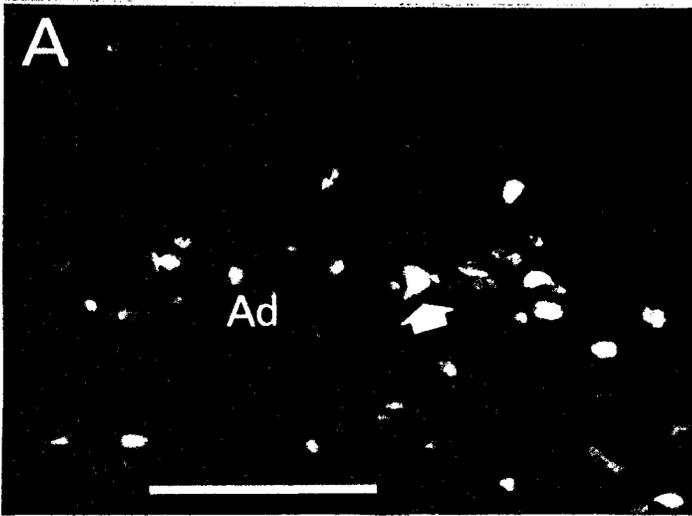


Fig. 39.- Microfotografías de fluorescencia de células marcadas en diferentes núcleos troncoencefálicos tras la inyección de azul verdadero (av) en la izquierda y amarillo diamidino (ad) en la derecha del bulbo ventrolateral. A: Neuronas marcadas con av y ad en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario tras inyecciones en ambos GRV rostral. B: Neurona doblemente marcada (flecha) en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario tras inyecciones en ambos GRV caudal. C: Neuronas marcadas con av y ad en el Complejo de Bötzinger tras inyecciones en ambos GRV caudales. D: Neuronas doblemente marcadas en el Complejo de Bötzinger tras inyecciones en ambos GRV rostrales. Flechas, neuronas doblemente marcadas con av y ad. Barras en A y C: 100 μ . Barras en B y D: 25 μ .



total) que las encontradas tras la inyección del trazador en el Complejo de Bötzinger. Además, se localizaron neuronas doblemente marcadas en el núcleo ventrolateral de tracto Solitario; si bien éstas sólo representaron un 1% de las neuronas marcadas en dicha zona (Fig. 39A). En ningún experimento se observaron neuronas doblemente marcadas en el GRV caudal.

4.4.4.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral caudal

Unicamente se localizaron neuronas doblemente marcadas en el Complejo de Bötzinger (Fig. 39C) y en el GRV rostral desde 0,8 hasta 1 mm rostral al cero (Fig. 38B). Sin embargo, estas neuronas sólo representaron, aproximadamente, un 1% del total de las neuronas marcadas en dichas áreas. A diferencia de las dos series experimentales anteriores, no se encontraron neuronas doblemente marcadas en los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, en ninguno de los experimentos; tan sólo aparecieron muy pocas neuronas doblemente marcadas en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario en un solo experimento (Fig. 39B).

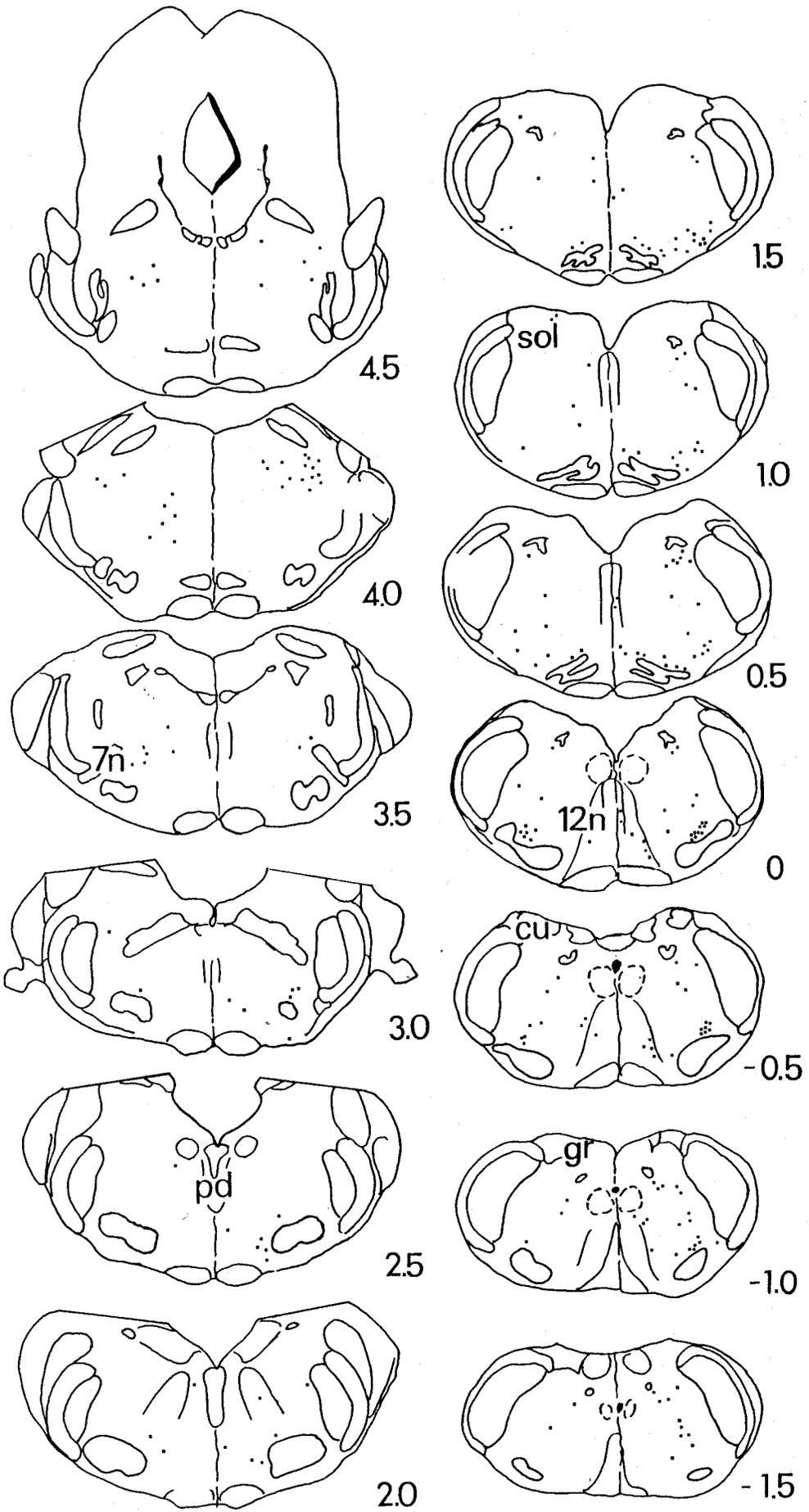
4.5.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL

El principal objetivo de este apartado fue la localización de las neuronas que proyectan desde las principales subdivisiones del GRV al núcleo frénico de la médula espinal cervical. Al mismo tiempo, se pretendió estudiar la importancia relativa de estas proyecciones bulboespinales, en comparación con otras posibles fuentes de proyección sobre el núcleo frénico.

En esta serie experimental, sólo un reducido número de núcleos bulboprotuberanciales presentaron neuronas marcadas tras la inyección de azul rápido en el núcleo frénico (Fig. 40). Las neuronas marcadas se localizaron en las áreas siguientes:

i) dispersas en las distintas subdivisiones de la formación reticular del bulbo (gigantocelular, paramediana, bulbar ventral y

Fig. 40.- Diagramas representativos de secciones coronales bulboprotuberanciales en los que se muestra la distribución de las neuronas marcadas con azul rápido (puntos). Los puntos en la izquierda representan neuronas con proyección homolateral; mientras que en el lado opuesto representan neuronas con proyección contralateral al núcleo frénico. Cada punto representa dos células en una sección de 100 μ de espesor. Coordenadas y abreviaturas como en la figura 29.



bulbar dorsal) y de la protuberancia (parvocelular rostral). Estas neuronas marcadas constituyeron un 25% del total.

ii) núcleos del rafe bulbares (pálido y oscuro), siendo un 8% del total de las neuronas marcadas.

iii) núcleos de la protuberancia tales como parabraquial medial, de Kölliker-Fuse y subcerúleo, contribuyendo con un 8% del total de las proyecciones al núcleo frénico.

iv) núcleo ventrolateral del tracto Solitario, representando un 3% del total de las neuronas marcadas.

v) el 60% restante de las neuronas que proyectan al núcleo frénico se localizó en el GRV. No obstante, éstas no se dispusieron de forma homogénea a lo largo del GRV, ya que la mayor parte de dichas proyecciones axonales (75%) se localizó en el GRV rostral, el 20% en el Complejo de Bötzing y el 5% restante en el GRV caudal. La tabla 3 resume el número de neuronas contabilizadas en los distintos núcleos bulboprotuberanciales, así como la proporción de las proyecciones homolaterales y contralaterales.

4.6.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES BILATERALES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL

El principal objetivo de este apartado fue localizar qué neuronas, de las descritas en la serie experimental anterior, proyectan a ambos núcleos frénicos mediante colaterales axónicas.

Estos experimentos mostraron un 90% de las neuronas doblemente marcadas localizadas en el GRV rostral; es decir, en la zona del GRV que aporta mayor número de proyecciones axonales al núcleo frénico en la rata (Tabla 3; Figs. 41 y 42A y B). Las neuronas doblemente marcadas estuvieron presentes en todos los experimentos realizados y constituyeron un 6,5% del total de las neuronas marcadas en dicha área (rango 2,5-15%). No se encontraron neuronas doblemente marcadas en la porciones más rostrales y caudales del GRV (Complejo de Bötzing y GRV caudal,

respectivamente) tras la inyección simultánea en ambos núcleos frénicos. En 5 experimentos se observaron neuronas doblemente marcadas en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario (Fig. 42D). Este área bulbar envía un número reducido de proyecciones axonales al núcleo frénico, en la rata. Las neuronas doblemente marcadas representaron el 7,5% del total de las neuronas marcadas en dicha zona (rango 0-14,3%). En un solo experimento, otros 4 núcleos bulboprotuberanciales presentaron neuronas doblemente marcadas, de forma aislada: 1 neurona en el núcleo reticular paramedial; 3 neuronas en el núcleo reticular bulbar, división ventral; 1 neurona en el núcleo parabraquial medial y 3 neuronas en el núcleo de Kölliker-Fuse (Fig. 42C).

Los músculos intrínsecos de la laringe se inyectaron con fluoro oro en 4 animales. Las motoneuronas marcadas se localizaron a lo largo del núcleo Ambiguo, desde 1 mm caudales al cero hasta 1,6 mm rostrales al mismo. Todas las neuronas bulboespinales marcadas, con azul rápido, amarillo diamidino o doblemente marcadas con ambos fluorescentes, en el Complejo de Böttinger se localizaron ventrales y ventrolaterales a las motoneuronas laríngeas (Figs. 41C y 42F). Sin embargo, en el GRV rostral las neuronas bulboespinales que proyectan al núcleo frénico se observaron también entremezcladas con las motoneuronas laríngeas (Figs. 41A y B y 42E), e incluso dorsales a las mismas. Tomando como referencia las motoneuronas laríngeas, la localización de las neuronas bulboespinales que proyectan al núcleo frénico bilateralmente mediante colaterales axónicas fue similar a la de las neuronas bulboespinales que sólo envían proyecciones axonales a un lado de la médula espinal cervical.

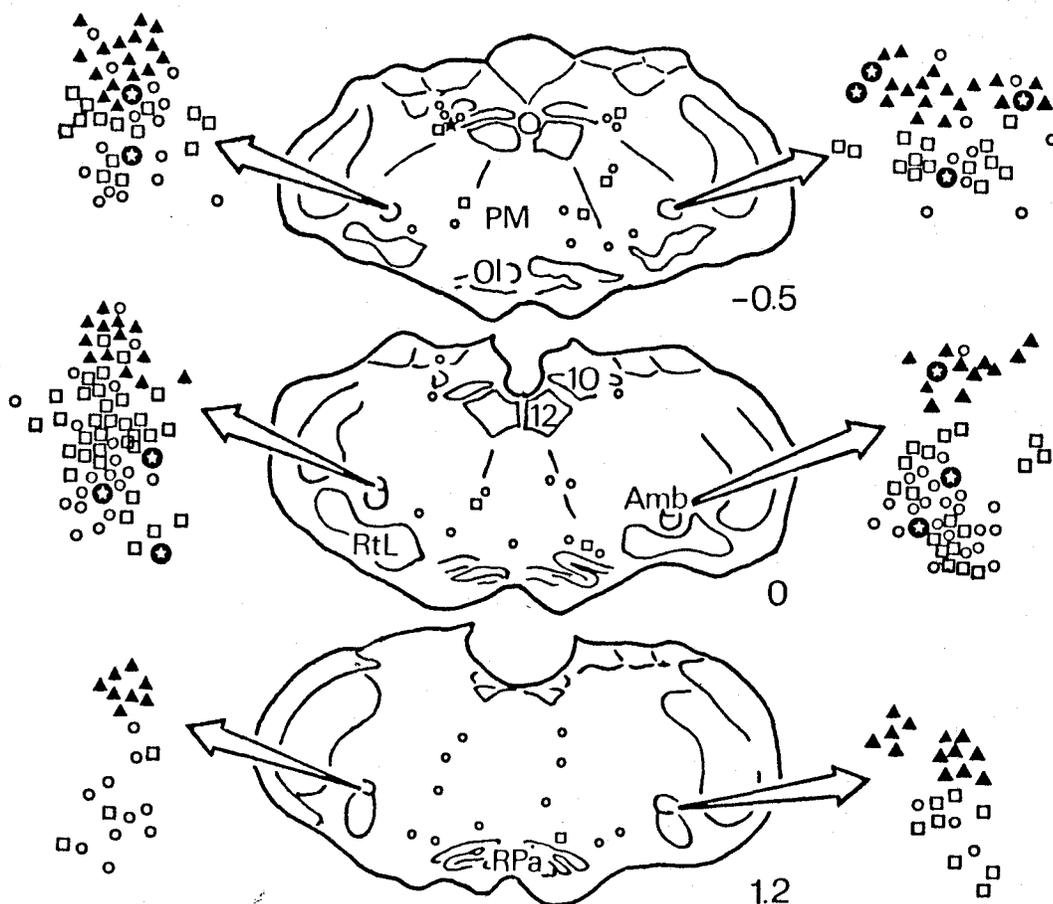


Fig. 41.- Diagramas representativos de secciones coronales del bulbo en los que se muestra la distribución de las neuronas marcadas con azul rápido (círculos), amarillo diamidino (cuadrados) o ambos (estrellas). Los círculos en la izquierda y los cuadrados en la derecha representan neuronas con proyección homolateral; mientras que en el lado opuesto representan neuronas con proyección contralateral. Las estrellas representan neuronas con proyecciones axonales bilaterales a ambos núcleos frénicos. En los márgenes se detallan las localizaciones de las neuronas marcadas en el GRV rostral (a,b) y Complejo de Bötzing (c) con respecto a las motoneuronas laríngeas marcadas con fluoro oro (triángulos negros). Abreviaturas y significado de los puntos como en la figura 29.

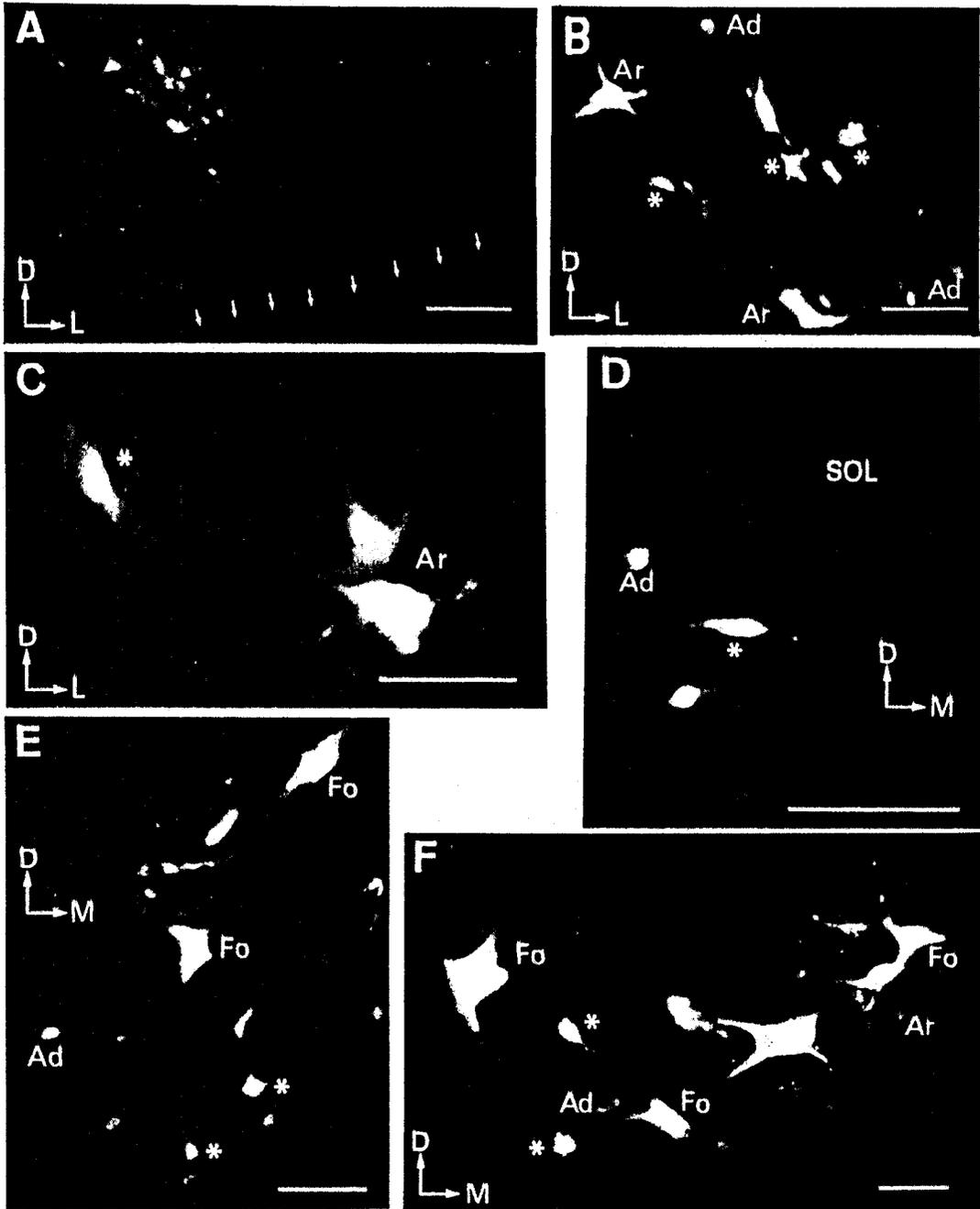
TABLA 3

Resumen de los resultados cuantitativos obtenidos tras la inyección bilateral con amarillo diamidino y azul rápido, respectivamente en el núcleo frénico.

Núcleos con neuronas marcadas	Número de neuronas marcadas							
	ad		ar		ad ó ar		ad/ar	
	N	rango	N	rango	h%	c%	N	rango
CB	23,4	7-41	36,2	6-63	77,2	22,8	-	-
GRV rostral	114,1	45-158	129,5	40-174	58,9	41,1	15,6	2-28
GRV caudal	12,4	4-27	7,3	10-23	64,5	35,5	-	-
Rafe pálido	6,2	0-15	6,6	0-8	88,8	11,2	-	-
Rafe oscuro	15,9	1-19	21,3	1-31	92,4	7,6	-	-
Reticular								
parvocelular	12,2	0-14	4,3	0-11	81,6	18,4	-	-
gigantocelular	17,4	0-40	13,0	1-26	80,6	19,4	-	-
paramedial	19,8	6-27	25,4	3-36	67,6	32,4	0,06	0-1
medular								
ventral	16,1	7-39	22,1	8-44	70,3	29,7	0,18	0-3
dorsal	15,6	0-30	15,6	0-25	71,5	28,5	-	-
Tracto Solitario								
ventrolateral	14,5	0-23	10,3	0-44	75,4	24,6	1,86	0-6
Parabraquial								
medial	14,3	0-22	9,3	0-18	68,4	31,6	0,06	0-1
Kölliker-Fuse	9,6	0-17	9,9	2-18	70,7	29,3	0,18	0-3
Subcerúleo	3,8	0-5	5,0	0-16	92,3	7,7	-	-
TOTAL	295,3		315,85					

Abreviaturas: ad, amarillo diamidino; ar, azul rápido; ad/ar, doblemente marcadas con amarillo diamidino y azul rápido, simultáneamente; N, media de neuronas marcadas en cada núcleo; h, homolateral; y c, contralateral en porcentajes.

Fig. 42.- Microfotografías de fluorescencia de células marcadas en diferentes núcleos bulbotuberanciales tras la inyección de azul verdadero (av) en el núcleo frénico izquierdo y amarillo diamidino (ad) en el derecho de la médula espinal cervical. A y B: Neuronas marcadas con av, ad, o doblemente marcadas (asteriscos) en el GRV rostral; a menor (A) y a mayor (B) aumento para poder observar la localización en el bulbo raquídeo. Barras: 300 μ y 100 μ , respectivamente. C: Neuronas marcadas en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario. Barra: 50 μ . E y F: Neuronas bulboespinales marcadas con av, ad y con ambos fluorocromos, situadas ventrales y ventrolaterales a las motoneuronas laríngeas marcadas con fluoro oro (fo) en E; y entremezcladas con estas últimas en F. Barras: 50 μ . D, dorsal; L, lateral.



5.- DISCUSSION

El núcleo Ambiguo de la rata consiste en una columna longitudinal de neuronas multipolares de gran tamaño, situada ventral al núcleo reticular parvocelular y dorsal al núcleo reticular lateral. Esta columna celular se extiende desde el límite caudal del núcleo facial hasta la decusación piramidal (Bystrzycka y Nail, 1985). Estudios clásicos demostraron que dicho núcleo posee una enorme complejidad estructural debido a la variedad de las motoneuronas que contiene (Lawn, 1966a y b). No obstante, estudios posteriores pusieron de manifiesto que las distintas subpoblaciones que componen el núcleo Ambiguo se encuentran organizadas viscerotópicamente (Bieger y Hopkins, 1987; Feldman y col., 1985; Grélot y col., 1989a; Portillo y Pásaro, 1988b).

Estudios morfológicos y electrofisiológicos hicieron patente la existencia de un Grupo Respiratorio Ventral (GRV) asociado al núcleo Ambiguo. Este grupo contiene neuronas bulboespinales premotoras de las motoneuronas frénicas, intercostales y abdominales (Ellenberger y Feldman, 1988; Feldman y col., 1985; Onai y col., 1987b) y neuronas propiobulbares que interconectan con neuronas de otros grupos respiratorios troncoencefálicos (Ellenberger y Feldman, 1990a; Núñez-Abades y col., 1990). El GRV de la rata se dividió, a su vez, en tres subgrupos morfofuncionales: i) Complejo de Böttinger, constituido por las neuronas más rostrales del GRV, fundamentalmente espiratorias; ii) GRV rostral, o parte intermedia del GRV, que contiene principalmente neuronas inspiratorias y iii) GRV caudal formado por neuronas espiratorias (Ellenberger y Feldman, 1990b; Ezure y col., 1988; Saether y col., 1987; Zheng y col., 1991a).

Dada la enorme complejidad estructural que posee el Grupo Respiratorio Ventral, en general, y el núcleo Ambiguo en particular, se proyectó reexaminar en detalle la organización neuronal del bulbo ventrolateral prestando atención a la distribución en el espacio de unas subpoblaciones neuronales frente

a otras. El trabajo se completó con el estudio de las aferencias y de las principales eferencias de dicho GRV. La técnica elegida, el marcaje neuronal por transporte axónico retrogrado múltiple, incluso con cuatro marcadores fluorescentes, se reveló como una herramienta útil para la visualización, en una misma preparación, de las distintas poblaciones que forman el núcleo Ambiguo y el GRV. Además, dicha técnica permitió la caracterización de las neuronas que localizadas en dichas áreas poseen colaterales axónicas y proyectan a más de una subdivisión respiratoria.

5.1.- CARACTERIZACION DE LAS NEURONAS CRANEALES DEL NUCLEO AMBIGUO

En el núcleo Ambiguo de la rata se localizan las motoneuronas laríngeas, faríngeas y esofágicas y las neuronas preganglionares parasimpáticas relacionadas con funciones cardiovasculares y otras funciones autónomas (Bieger y Hopkins, 1987; Kalia y Sullivan, 1982; Portillo y Pásaro, 1988b). Sin embargo, se desconocía la precisa organización topográfica de cada una de las distintas subpoblaciones de motoneuronas, debido al solapamiento de dichas poblaciones dentro del núcleo Ambiguo. Así mismo, la posible existencia de motoneuronas que inerven, mediante colaterales axónicas, más de un músculo constituía un tema de debate para diversos autores. De hecho, tras la estimulación eléctrica de los nervios laríngeo recurrente y laríngeo superior, en la rata, se evocó potenciales de acción antidrómicos simultáneos en la misma neurona (Yayima y Hayashi, 1989). Este mismo hecho se manifestó cuando se estimularon distintas ramas del nervio laríngeo recurrente en el gato (Grélot y col., 1989b). En los resultados presentes, estudiando en detalle la organización anatómica de los distintos grupos de motoneuronas que constituyen el núcleo Ambiguo mediante la inyección de cuatro marcadores fluorescentes, no se encontraron motoneuronas doblemente marcadas, es decir, con colaterales axónicas que proyectan a más de un músculo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en la rata, también con técnicas anatómicas, respecto del tamaño, morfología y proyecciones de dichas neuronas (Portillo y Pásaro, 1988b), pero discrepan de los datos obtenidos con técnicas electrofisiológicas (Yayima y Hayashi, 1989). Experimentos realizados en el perro

(Hisa, 1984) y en el gato (Grélot y col., 1989a y b) sobre motoneuronas laríngeas y faríngeas indicaron que las motoneuronas del núcleo Ambiguo poseen colaterales axónicas. Sin embargo, estos resultados no se pudieron corroborar apoyados morfológicamente en la rata (Núñez-Abades y col., 1992a; Portillo y Pásaro, 1988b). Las diferencias obtenidas, respecto a la ausencia de ramificaciones axonales en las eferencias de las motoneuronas faríngeas de la rata, implica que la organización anatómica de las motoneuronas faríngeas en esta especie es más simple que la que se da en el gato. Como base morfológica para este fenómeno, se conoce que en la rata no existe el músculo constrictor faríngeo craneal (Bieger y Hopkins, 1987). Este hecho sugiere que a medida que el número de motoneuronas que inerva un mismo músculo aumenta, también se incrementa la complejidad de sus ramificaciones axonales (Grélot y col., 1989a).

La organización topográfica del núcleo ambiguo encontrada es semejante a descripciones morfológicas previas del núcleo (Bieger y Hopkins, 1987; Portillo y Pásaro, 1988b). No obstante, el uso simultáneo de cuatro trazadores neuronales permitió describir con detalle la posición relativa de las distintas subpoblaciones que lo componen. En la parte caudal del núcleo, caudal al cero, sólo se encontraron motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente y, dorsales y ventrales a ellas, neuronas parasimpáticas vagales. En su parte intermedia, las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente se dispusieron ventromediales y ventrolaterales a las motoneuronas faríngeas vagales. En la parte rostral (también denominado núcleo retrofacial) las motoneuronas esofágicas constituyeron la parte central del núcleo; mediales a ellas se localizaron las faríngeas vagales; ventrales a las esofágicas se hallaron las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo superior y ventrales y ventrolaterales a todas las anteriores, las neuronas parasimpáticas vagales y glossofaríngeas. Dorsalmente al núcleo facial se encontró la porción más rostral del núcleo Ambiguo y en ella se ubicaron las motoneuronas faríngeas del glossofaríngeo, mediales a las motoneuronas esofágicas más rostrales.

5.1.1.- Consideraciones funcionales

La estructura citoarquitectónica del núcleo Ambiguo demostrada en el presente trabajo sugiere un alto grado de organización viscerotópica. Las motoneuronas agonistas, aquellas que inervan el cricoaritenideo posterior, cricotiroideo y músculos constrictores faríngeos se encuentran situadas en la parte rostral del núcleo Ambiguo y las que inervan el cricoaritenideo lateral y tiroaritenideo se disponen solapadamente en la parte caudal del núcleo (Bieger y Hopkins, 1987; Núñez-Abades y col., 1992a; Portillo y Pásaro, 1988b). Esta imbricación de las poblaciones de motoneuronas agonistas podría significar que comparten las mismas entradas sinápticas; ya que comparten, así mismo, el estar implicadas en funciones, tales como fonación, vómito, deglución, respiración, etc (Bystrzycka y Nail, 1985). Este hecho se basa, además, en otros datos morfológicos, constatados así mismo en el presente trabajo, tales como la orientación de sus árboles dendríticos: i.e. estos se extienden dorsomedialmente hacia el tracto Solitario donde terminan los aferentes de los baroreceptores, receptores de estiramiento pulmonar, gustativos, etc. (Altschuler y col., 1989; Bystrzycka y Nail, 1985). Por otro lado, estas neuronas están inmersas en el GRV, cuyas neuronas poseen patrones de descarga, aferencias axonales y características morfológicas similares (Ezure y col., 1988; Núñez-Abades y col., 1991a). Así pues, la distribución y morfología de las neuronas del núcleo Ambiguo en la rata sugieren que su localización es ideal para el desarrollo de interacciones complejas entre ellas y otras neuronas del GRV; estas interrelaciones son necesarias a la hora de desarrollar reflejos importantes para la vida: deglución, vómito, etc. y que necesitan de una coordinación muy fina de los diferentes grupos de motoneuronas.

5.2.- CARACTERIZACION DE LA ORGANIZACION TOPOGRAFICA DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

En este estudio se examinó la localización, morfología y orientación de los árboles dendríticos de tres poblaciones de neuronas en el núcleo Ambiguo y formación reticular adyacente que constituye el GRV, tales como: i) neuronas bulboespinales que

proyectan a las motoneuronas frénicas; ii) interneuronas propiobulbares que proyectan a las neuronas espiratorias del GRV caudal y iii) motoneuronas vagales y glossofaríngeas que proyectan a los músculos faríngeos, laríngeos y esofágicos (Ellenberger y Feldman, 1990b; Zheng y col., 1991a). Se investigaron ambos lados del bulbo raquídeo para determinar la organización bilateral de las redes neuronales implicadas en la función respiratoria y la relativa importancia de las proyecciones homolaterales y contralaterales, un hecho no estudiado previamente por otros autores (Ellenberger y Feldman, 1990b; Portillo y Pásaro, 1988a). Por último, el uso simultáneo de tres marcadores fluorescentes permitió detectar la posible existencia de neuronas con colaterales axónicas. Sin embargo, no se observaron neuronas doblemente marcadas, lo cual denegó la existencia de las asumidas colaterales axónicas desde interneuronas bulboespinales y propiobulbares del Complejo de Bötzingen hacia otras áreas del GRV y médula espinal, que habían sido descritas mediante métodos electrofisiológicos en el gato (Ezure, 1990). La interpretación de los sitios de inyección con marcadores retrogradados fluorescentes se discute en el apartado 5.3.1.

5.2.1.- Neuronas propiobulbares

La distribución de las neuronas propiobulbares marcadas con fluorescente se relacionó con las tres regiones descritas del GRV: Complejo de Bötzingen, GRV rostral y GRV caudal. La mayor densidad de neuronas marcadas en el Complejo de Bötzingen tras inyecciones de fluorocromo en las otras dos subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral se observó en la región homolateral que va desde 1 hasta 1,4 mm rostrales al punto de referencia tomado como cero (borde rostral del área postrema). Esta vía de proyección, predominantemente homolateral, une las subdivisiones más rostral y más caudal del GRV, ambas subdivisiones poseen además neuronas espiratorias (Bianchi, 1971; Merrill, 1970). Esta proyección se demostró recientemente mediante promediado de espigas (Jiang y Lipski, 1990). Dentro del área inspiratoria del GRV, es decir, desde 0,9 mm caudales hasta 0,9 mm rostrales al cero, las neuronas propiobulbares marcadas exhibieron distintos picos de densidad; indicando una complejidad topográfica considerable en un área del

GRV que agrupa distintos tipos de neuronas propiobulbares (Ellenberger y Feldman, 1990a y b; Ezure y col., 1988). Por ejemplo, el número de neuronas marcadas rostral al cero fue aproximadamente igual a ambos lados de la línea media. Sin embargo, caudal al cero, apareció un mayor número de células marcadas homolaterales al sitio de inyección. Este hecho podría indicar una organización diferencial dentro del propio GRV rostral de las proyecciones axonales al GRV caudal, que se correspondería con las propiedades funcionales de dicho GRV caudal; si bien dichas propiedades tendrían que ponerse de manifiesto por técnicas de registro electrofisiológico. Además, se encontraron algunas neuronas marcadas contralaterales al sitio de inyección, neuronas que conectan ambos lados del propio GRV caudal.

La observación de las neuronas propiobulbares marcadas en el plano coronal puso de manifiesto su organización en dos agregaciones celulares, una ventral y otra dorsal, respecto del núcleo Ambiguo. La subdivisión correspondiente a las neuronas localizadas dorsales al núcleo Ambiguo fue más densa en el GRV caudal; mientras que la subdivisión correspondiente a las neuronas localizadas ventral al núcleo Ambiguo se extendió, uniformemente, a todo lo largo del GRV. Esta organización diferencial sugiere, de forma contundente, que estas dos subdivisiones anatómicas (dorsal y ventral al núcleo Ambiguo) se corresponderían con dos poblaciones neuronales funcionalmente diferentes. Así, se ha demostrado que las neuronas cardiovasculares están localizadas preferentemente en la parte ventrolateral del bulbo, ventrales al núcleo Ambiguo (Guyenet y col., 1990).

5.2.2. - Neuronas bulboespinales

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación indicaron la presencia de dos subpoblaciones diferentes de neuronas bulboespinales marcadas. La primera subpoblación se localizó entre 0,9 y 1,6 mm rostrales al cero, nivel correspondiente al Complejo de Böttinger, área que posee fundamentalmente proyecciones axonales espinales homolaterales. Esta relación, Complejo de Böttinger-médula espinal, se ha demostrado previamente mediante técnicas electrofisiológicas en el

gato; poniéndose de manifiesto la existencia de una vía inhibitoria monosináptica desde el Complejo de Bötzingen a las motoneuronas frénicas (Merril y Fedorko, 1984). Así pues, estas neuronas bulboespinales podrían constituir, en la rata, la conexión anatómica entre el Complejo de Bötzingen bulbar y las motoneuronas frénicas espinales, ya demostrada en el gato. La segunda población, más importante en número, se localizó caudal a la anteriormente descrita. Las neuronas bulboespinales enviaron sus proyecciones axonales bilateralmente; es decir, igual número de proyecciones homolaterales que de contralaterales, a la médula espinal cervical. Esta relación podría ser el correlato morfológico de la conexión entre las neuronas bulboespinales premotoras inspiratorias, excitadoras, sobre las motoneuronas frénicas; como ya se demostró en otros estudios morfológicos y electrofisiológicos (Ellenberger y Feldman, 1988; Onai y col., 1987b; Yamada y col., 1988).

5.2.3.- Organización en el Grupo Respiratorio Ventral de las neuronas propiobulbares, neuronas bulboespinales y motoneuronas

Tres poblaciones neuronales distintas, dentro del bulbo ventrolateral, se marcaron con diferentes fluorocromos: i) neuronas bulboespinales; ii) propiobulbares y iii) motoneuronas. Como ya demostraron Ellenberger y Feldman (1990b), estas neuronas están a su vez organizadas en grupos subnucleares. Sin embargo, el presente estudio fue diferente a los realizados por otros autores, en la rata, debido a que: i) se marcaron retrógradamente las neuronas bulboespinales que proyectan al GRV caudal; ii) se contabilizaron las neuronas marcadas a ambos lados de la línea media y iii) se examinó el núcleo Ambiguo en su conjunto, incluyendo la formación semicompacta, la cual no se había estudiado en trabajos previos (Ellenberger y Feldman, 1990b, Portillo y Pásaro, 1988a).

Corroborando los hallazgos de Ellenberger y Feldman (1990b), se demostró que la distribución subnuclear de los tres tipos de neuronas es diferente en el GRV caudal, GRV rostral y Complejo de Bötzingen. Sin embargo, en desacuerdo con dicho trabajo (Ellenberger y Feldman, 1990b) la población de neuronas propiobulbares no está organizada como la mostrada tras la inyección en el GRV rostral; ya que en el presente trabajo se

inyectó donde se registró actividad espiratoria, es decir, en el GRV caudal. En la parte caudal del GRV, la columna de células marcadas estaba constituida por neuronas propiobulbares y bulboespinales solapadas, rodeando a unas pocas motoneuronas vagales. En la parte intermedia, o GRV rostral, las poblaciones de neuronas propiobulbares y bulboespinales, con un grado de solapamiento menor que a nivel del GRV caudal, situándose preferentemente ventrolaterales al núcleo Ambiguo. A este nivel, el núcleo Ambiguo estuvo formado por numerosas motoneuronas vagales. Por último, en la parte más rostral del GRV, Complejo de Bötzing, se observó la mayor densidad de motoneuronas vagales y glossofaríngeas y, ventrales a ellas, se localizaron las neuronas propiobulbares y bulboespinales.

5.2.4.- Consideraciones funcionales

La organización de los tres tipos de neuronas observada dentro de la columna de células del GRV, a lo largo del bulbo ventrolateral, podría servir de base para estudios electrofisiológicos posteriores; ya que tal diversificación morfológica podría correlacionarse con la diversificación funcional mostrada en los registros de la actividad neuronal. Por ejemplo, se ha demostrado, en el gato, la existencia de conexiones homolaterales excitatorias entre las neuronas espiratorias del Complejo de Bötzing y las neuronas bulboespinales del GRV caudal (Jiang y Lipski, 1990) y bilaterales inhibitorias entre las neuronas espiratorias del Complejo de Bötzing y GRV caudal y GRV rostral (Fedorko y Merrill, 1984a). Así mismo, la organización de las neuronas bulboespinales y propiobulbares que rodean a las motoneuronas del núcleo Ambiguo, en agrupaciones muy definidas, sugiere la posibilidad de conexiones mediante colaterales axónicas entre ellas. Esta última posibilidad se ha demostrado, en el gato, para las neuronas bulboespinales inspiratorias y las motoneuronas inspiratorias (Ezure y Manabe, 1989).

5.3.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES A LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

En este estudio se describió la distribución bulboprotuberancial de las neuronas propiobulbares de la rata que proyectan a las mayores subdivisiones del GRV (Ellenberger y Feldman, 1990b; Zheng y col., 1991a). En particular se estudió la organización de las diferentes poblaciones neuronales que proyectan al Complejo de Bötzing, GRV rostral y GRV caudal. En la rata, se han descrito, en general, las neuronas que proyectan al GRV (Ellenberger y Feldman, 1990a), pero no se disponía en la actualidad de una información detallada de las proyecciones axonales específicas a cada subdivisión del GRV.

5.3.1.- Interpretación de los sitios de inyección

El definir los límites precisos de los sitios de inyección para el transporte retrógrado de los marcadores fluorescentes ha sido un punto de controversia en este tipo de experimentos de trazadores neuronales (Núñez-Abades y col., 1990). Los sitios de inyección de los experimentos con azul rápido, tras siete días de supervivencia, se observaron al microscopio de fluorescencia y aparecieron con una zona central de cristales azul brillante, rodeada por un halo de color azul claro, con numerosos células de la glia marcadas en azul (Figs. 5A, C y E). Los datos obtenidos sugieren que el cuerpo central opaco del sitio de inyección es el área efectiva donde hay captación del marcador por los axones. Por ejemplo, cuando el cuerpo central opaco se limitó al Complejo de Bötzing, sin afectar al núcleo Ambiguo, el número de neuronas marcadas en el subnúcleo central del tracto Solitario fue muy pequeño (Tabla 1). Sin embargo, cuando la zona central alcanzó al núcleo Ambiguo, el número de neuronas marcadas en el subnúcleo central fue muy elevado. Desde el punto de vista de los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que el marcador azul rápido no es específico para una determinada función neuronal, se asumió que las neuronas marcadas están relacionadas con la respiración; ya que el marcador se inyectó en un área específica donde se registró máxima actividad extracelular respiratoria. Sin embargo, dicha hipótesis debe ser refrendada por investigaciones con métodos

electrofisiológicos, debido a que las neuronas responsables de la función cardiovascular están muy cercanas (posiblemente incluso solapadas) a la zona que ocupan las neuronas respiratorias (Feldman y Ellenberger, 1988). Por tanto, las inyecciones realizadas atendiendo a criterios respiratorios tendrían que realizarse, así mismo, atendiendo a criterios cardiovasculares. De este modo, se podría distinguir las poblaciones neuronales que proyectan a las áreas respiratorias y las que proyectan a las áreas cardiovasculares del bulbo ventrolateral.

5.3.2.- Interconexiones entre las neuronas del Grupo Respiratorio Ventral

El patrón de distribución de los somas marcados en la formación reticular ventrolateral bulbar, tras las distintas inyecciones en el GRV, sugiere que sus tres subdivisiones están extensivamente y recíprocamente interconectadas de forma homolateral y, en menor medida, contralateralmente. Aunque este patrón de conexiones propiobulbares se observó también en el gato, la conectividad homolateral fue más preponderante en la rata que en el gato (Núñez-Abades y col., 1989a; Smith y col., 1989). Tras las tres series experimentales, se encontraron poblaciones de neuronas situadas justo contralaterales al mismo nivel de la inyección (en coordenadas idénticas), lo que sugiere que las neuronas marcadas suponen un nexo entre ambos Complejos de Bötzing, GRV rostral y GRV caudal. En el gato, este tipo de neuronas que unen las áreas respiratorias a un lado y otro de la línea media se describieron sólo en los dos primeros casos, Complejo de Bötzing y GRV rostral, pero no se encontraron para el GRV caudal (Ezure, 1990). Este hecho puede ser debido a la presencia de neuronas bulboespinales sin colaterales axónicas en el GRV caudal (Arita y col., 1987). En la rata, las neuronas bulboespinales sí poseen colaterales axónicas (Zheng y col., 1991a y b); con lo cual, además de ser neuronas premotoras para las motoneuronas espinales espiratorias, también podrían estar conectando ambos GRV caudales. No obstante, con la metodología seguida, no se puede descartar la posibilidad de que estas neuronas propiobulbares constituyeran una nueva subpoblación neuronal, aún no descrita en el gato.

La localización y disposición en el plano coronal de las neuronas marcadas a lo largo del GRV fue similar en las tres series experimentales. Las neuronas marcadas en el GRV caudal presentaron una distribución laxa y ocuparon posiciones más dorsales que en los niveles más rostrales del GRV. En el GRV rostral, dicha distribución fue más compacta y las neuronas se localizaron preferentemente ventrales al núcleo Ambiguo. Por último, en el Complejo de Böttinger las neuronas presentaron una organización muy densa, localizadas casi exclusivamente ventrales y ventromediales al núcleo Ambiguo. Esta descripción de las neuronas propiobulbares en formación laxa, semicompacta y compacta coincide con la descrita para las motoneuronas del núcleo Ambiguo (apartado 4.2.3., Bieger y Hopkins, 1987; Núñez-Abades y col., 1992a), para las neuronas bulboespinales del GRV (apartado 4.2.2, Núñez-Abades y col., 1991a) y para las interneuronas del GRV (apartado 4.2.1., Núñez-Abades y col., 1991a). Por lo tanto, esta característica morfológica inherente al GRV, puede ser debida bien porque el bulbo raquídeo tenga su origen enbriológico en tres rombómeros diferentes y/o bien porque el GRV sufra una parcelación temprana en tres áreas diferenciadas (Ebesson, 1980). No obstante, la distribución de las neuronas marcadas para cada tipo de inyección fue distinta en el eje rostrocaudal (Ellenberger y Feldman, 1990b; Núñez-Abades y col., 1991a). Las múltiples interconexiones encontradas entre las tres subdivisiones del GRV se demostraron mediante técnicas electrofisiológicas en el gato y, en menor medida, en la rata (Bianchi y Barillot, 1982; Ellenberger y Feldman, 1990a; Fedorko y Merrill, 1984a; Jiang y Lipski, 1990; Núñez-Abades y col., 1991a). Estos hechos ponen de manifiesto la enorme complejidad que posee la red neuronal implicada en el control de la función respiratoria (ver Ezure, 1990).

5.3.3.- Núcleo del tracto Solitario

Los subnúcleos comisural, ventrolateral e intermedio proyectan, preferentemente homolateralmente, al GRV. Este resultado discrepa de los hallazgos en el gato, donde las proyecciones desde el núcleo del tracto Solitario al GRV fueron predominantemente contralaterales (Bystrzycka, 1980; Smith y col., 1989); pero se ajusta a los resultados obtenidos en la rata por otros autores

(Agarwall y Calaresu, 1990; Núñez-Abades y col., 1990; Ross y col., 1985). El papel respiratorio de los subnúcleos del tracto Solitario arriba mencionados les es atribuido a que en ellos terminan las aferencias provenientes de los receptores de estiramiento pulmonar (Kalia y Richter, 1985b). Por el contrario, muy pocas neuronas marcadas se obtuvieron en los subnúcleos del tracto Solitario relacionados con la función gastrointestinal o cardiovascular, tales como el gelatinoso, dorsomedial, parvocelular, medial y central (Agarwall y Calaresu, 1990; Onai y col., 1987a; Ross y col., 1985). En estos resultados se demostró que las conexiones entre los distintos subnúcleos del tracto Solitario y las tres subdivisiones del GRV están organizadas topográficamente; es decir, las neuronas que proyectan a niveles más rostrales del GRV se localizan más rostrales en el núcleo del tracto Solitario y viceversa. El núcleo central del tracto Solitario proyectó selectivamente al grupo de motoneuronas esofágicas de la formación compacta del núcleo Ambiguo; ya que sólo se encontraron neuronas propiobulbares marcadas en dicho subnúcleo cuando dichas motoneuronas se impregnaron también del fluorocromo inyectado. Este hecho confirma descripciones anatómicas previas sobre dicha proyección desde el tracto Solitario y las motoneuronas del núcleo Ambiguo (Herbert y col., 1990; Ross y col., 1985).

El área postrema parece estar implicada en el control de las funciones gastrointestinal y cardiovascular y, a menudo, se considera parte del complejo del tracto Solitario porque también recibe aferencias vagales (Hyde y Miselis, 1984; Richard y col., 1989). Este área presentó proyecciones axonales eferentes de forma diferencial a los tres subgrupos del GRV: no se encontraron neuronas que proyectaran al Complejo de Böttinger y el número de neuronas marcadas fue mayor a medida que la inyección se situó más caudalmente en el GRV. Sólo se puede interpretar fisiológicamente esta proyección diferencial relacionándola con la integración visceral; aunque se necesitaría realizar otro tipo de estudio más fino para alcanzar conclusiones más objetivas.

5.3.4.- Núcleos parabraquial y de Kölliker-Fuse

El núcleo parabraquial se ha dividido en diez subnúcleos, citoarquitectónicamente distintos, que envían diferentes proyecciones axonales (Fullwiler y Saper, 1984). De todo estos subnúcleos, sólo el parabraquial medial junto con el núcleo de Kölliker-Fuse, se han considerado que estén implicados directamente en la modulación del patrón respiratorio (Bertran y Hugelin, 1971; Feldman, 1986). En el presente trabajo, se ha demostrado que los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, y los subnúcleos central y dorsal del parabraquial lateral están fuertemente conectados con el GRV. Estas proyecciones axonales son muy numerosas (Tabla 1), constituyendo la fuente más importante de proyección al GRV. Así mismo, se puso de manifiesto que las proyecciones axonales desde el núcleo de Kölliker-Fuse hacia el GRV se organizaron topográficamente; en concordancia con descripciones anatómicas previas de las conexiones entre el área respiratoria pontina y el GRV (Fullwiler y Saper, 1984; Herbert y col., 1990). En el gato, se encontró una mayor densidad de proyecciones axonales desde el núcleo de Kölliker-Fuse al Complejo de Böttinger (Smith y col., 1989), lo que llevó a la hipótesis de que la acción moduladora de la respiración, ejercida por este área pontina, podría estar mediada vía Complejo de Böttinger. Sin embargo, en la rata, la mayor densidad de marcaje neuronal retrógrado se encontró en el núcleo parabraquial medial. La posible implicación fisiológica de estas diferencias morfológicas, en cuanto a las proyecciones axonales, sobre el patrón respiratorio no se conocerán a ciencia cierta hasta que se realicen los pertinentes experimentos de registro electrofisiológico de la actividad neuronal. Existen numerosos estudios sobre este particular realizados en el gato (Feldman, 1986); mientras que, hasta la fecha, no se ha realizado ninguno para determinar si los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse posean neuronas respiratorias en la rata y que además proyecten sobre el GRV.

5.3.5.- Núcleo paragigantocelular lateral

El núcleo paragigantocelular lateral se ha dividido en dos subregiones basándose en la organización de las proyecciones

aferentes que le llegan: i) una parte caudal, localizada medial y ventromedial al Complejo de Bötzing y ii) una parte rostral, situada medial al núcleo facial (Andrezick y col., 1981). Ambas subdivisiones, pero particularmente la parte caudal, están implicadas en la mediación de reflejos que afectan al control respiratorio y cardiovascular (Feldman y Ellenberger, 1988; Richard y col., 1989; Stremel y col., 1990). Los resultados obtenidos en los presentes experimentos muestran neuronas marcadas en ambas subdivisiones del núcleo paragigantocelular lateral, sugiriendo una conexión entre dicho núcleo y el GRV, que probablemente puede estar implicada en la función respiratoria. Especialmente significativo fue el gran número de neuronas marcadas en el núcleo paragigantocelular lateral rostral, tras la inyección de fluorocromo en el GRV rostral, por lo que supone un fuerte nexo de unión con las neuronas inspiratorias del GRV rostral.

5.3.6.- Núcleo retrotrapezoide

El núcleo retrotrapezoide se describió, en el gato (Connelly y col., 1989; Smith y col., 1989) y en la rata (Pearce y col., 1989), como un grupo de células localizado anatómicamente cerca de la superficie ventral de la protuberancia. Estas neuronas podrían ser neuronas moduladoras de las funciones respiratoria y cardiovascular, actuando como transductores quimiosensoriales centrales; ya que estarían implicadas en la integración de variables fisiológicas tales como el pH del líquido cerebrospinal, que tienen que ser integradas por las neuronas responsables de la génesis respiratoria (Guyenet y col., 1990; Smith y col., 1989). Un número considerable de neuronas marcadas apareció en el núcleo retrotrapezoide homolateral tras la inyección de fluorescente en el GRV rostral y, en menor medida, se localizaron neuronas marcadas en dicho núcleo tras las inyecciones en el Complejo de Bötzing y en el GRV caudal. Este hecho, podría sugerir que la modulación respiratoria realizada por el núcleo retrotrapezoide lo es principalmente vía GRV rostral. El patrón de conexión demostrado en el presente trabajo, para la rata, entre el núcleo retrotrapezoide y el GRV fue diferente al observado en el gato, donde se describió una proyección similar para las tres subdivisiones del GRV (Smith y col., 1989).

5.3.7.- Campo tegmental lateral

Tras las tres series de inyecciones en el GRV se encontraron neuronas marcadas, dorsales al núcleo facial y dorsales al núcleo de la oliva superior, en el campo tegmental lateral; las últimas neuronas descritas solapando con el área A5 de neuronas noradrenérgicas. Así pues, esta evidencia morfológica sugiere la existencia de proyecciones desde el área A5 al GRV; área que se ha propuesto como fuente de inhibición noradrenérgica de la actividad rítmica respiratoria en la rata (Hilaire y col., 1989).

5.3.8.- Campo tegmental magnocelular

Un patrón de marcaje neuronal retrógrado diferencial apareció en el campo tegmental magnocelular tras los tres tipos de experimentos de inyección de fluorocromos en el GRV. Este estudio corroboró los resultados obtenidos en el gato, donde se encontró una proyección axonal desde este área al GRV (Smith y col., 1989). Esta conexión podría sustentar una vía nociceptiva para la modulación de la función respiratoria (Smith y col., 1989), función que sería igualmente válida para la descrita en el presente estudio en la rata.

5.3.9.- Núcleos del rafe

La estimulación de los distintos subnúcleos del rafe y, más específicamente, del rafe magno suprime la actividad frénica y disminuye la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca (Sessle y col., 1981). Así mismo, la lesión electrolítica del rafe magno atenuó los efectos respiratorios de dicha estimulación, pero no así los cardiovasculares (Richard y Stremel, 1990). En el presente trabajo se demostró que existe una fuerte proyección axonal desde los núcleos del rafe magno y oscuro al GRV. Algunas de estas conexiones axonales ya se habían descrito en la rata, tales como las del rafe oscuro al GRV rostral (Connelly y col., 1989). La importancia de estas proyecciones axonales en la formación del

patrón respiratorio y/o génesis del ritmo respiratorio aún no ha sido elucidada. Estas conexiones morfofuncionales constituyen uno de los temas que están adquiriendo cierto auge en el presente, ya que suponen la participación en el control cardio-respiratorio de núcleos que anteriormente no se consideraban implicados en dicha regulación.

5.3.10.- Núcleo trigémino espinal

Algunas neuronas marcadas se encontraron dentro de las distintas subdivisiones del núcleo trigémino espinal, aunque con un patrón de marcaje distinto en función de la subdivisión del GRV inyectada. Estas neuronas podrían estar implicadas en toda una serie de reflejos sensoriales trigeminales; tales como los reflejos nasofaríngeos que producen una poderosa inhibición de la respiración, en particular el reflejo de buceo (Smith y col., 1989).

5.3.11.- Consideraciones funcionales

Los experimentos presentes mostraron que, paralelamente a la localización diferencial de las neuronas respiratorias en el GRV (espiratorias en la zona rostral, inspiratorias en la zona intermedia y espiratorias en la zona caudal), existe una proyección axonal diferencial desde los distintos núcleos bulbotuberanciales:

i) las proyecciones aferentes desde los subnúcleos del tracto Solitario en el bulbo y desde el núcleo de Kölliker-Fuse en la protuberancia están organizadas topográficamente;

ii) las proyecciones aferentes son cualitativamente diferenciales por ejemplo: los núcleos del rafe magno y oscuro, no terminan sobre el GRV caudal; o bien, el área postrema no proyecta sobre el Complejo de Bötzing;

iii) las proyecciones aferentes son cuantitativamente diferenciales desde numerosas áreas bulbotuberanciales, por ejemplo: el núcleo retrotrapezoide proyecta preferentemente al GRV

rostral; o bien, el núcleo parabraquial proyecta en mayor medida al Complejo de Bötzingen; y, por último,

iv) los experimentos presentes demostraron el gran número de conexiones recíprocas existentes entre los tres subgrupos del GRV, las cuales podrían formar parte del entramado neuronal que genera el ritmo respiratorio. Los distintos subgrupos del GRV reciben proyecciones aferentes desde los subnúcleos ventrolateral, intermedio y comisural del tracto Solitario, los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, área A5, núcleo retrotrapezoide y los núcleos del rafe magno y oscuro que así mismo se consideran implicados en la modulación del patrón respiratorio (Fig. 43). Además, muy probablemente a través de neuronas del GRV, el bulbo ventrolateral recibe proyecciones axonales desde los subnúcleos medial, parvocelular y dorsomedial del tracto Solitario, área postrema, núcleo paragigantocelular lateral y parabraquial lateral que podrían estar implicados en la modulación de la función cardiovascular (Fig. 43). A este entramado neuronal hay que añadir las proyecciones axonales procedentes de los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, núcleo retrotrapezoide y los núcleos del rafe magno y oscuro que ejercen su influencia no sólo sobre la función respiratoria, sino también sobre la cardiovascular. De igual forma, los núcleos trigémino espinal y campo tegmental magnocelular, mediante sus proyecciones axonales al GRV, estarían integrando los reflejos sensoriales y nociceptivos que afectan a la génesis respiratoria. Los subnúcleos central, gelatinoso y parvocelular del tracto Solitario, núcleo parabraquial medial y área postrema podrían modular la función gastrointestinal a través de su proyección axonal, pongase por caso, sobre las motoneuronas esofágicas localizadas justo dorsales al Complejo de Bötzingen y, por tanto, también incluidas en la zona de inyección. La figura 43 resume el conjunto de las proyecciones axonales al GRV agrupadas según la función adcritas a los distintos núcleos bulboprotuberanciales por diversos autores (Ellenberger y Feldman, 1990a; Smith y col., 1989).

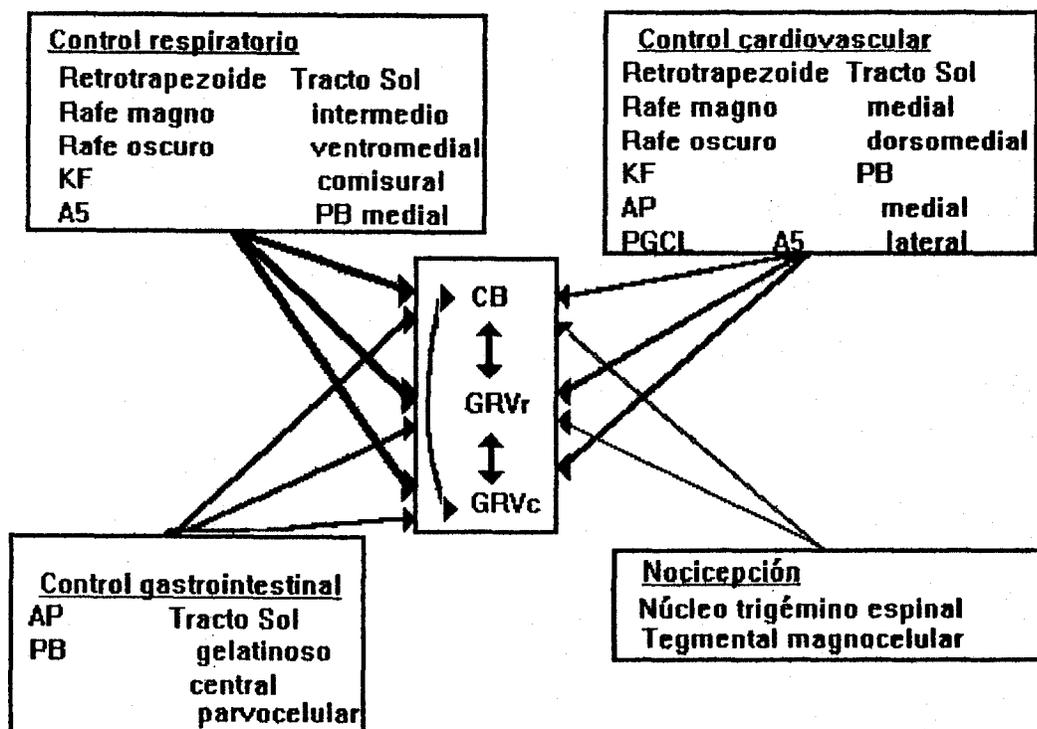


Fig. 43.- Esquema ilustrativo de las proyecciones axonales al GRV desde diferentes núcleos bulbotuberanciales implicados en la regulación de las funciones: respiratoria, cardiovascular, gastrointestinal y nociceptiva. Las líneas gruesas representan una proyección axonal más densa que las líneas finas. Abreviaturas: A5, área A5; AP, área postrema; CB, Complejo de Böttinger; GRVr, Grupo Respiratorio Ventral rostral; GRVc, Grupo Respiratorio Ventral caudal; KF, núcleo de Kölliker-Fuse; PB, núcleo parabranchial; PGCL, núcleo paragigantocelular lateral; Tracto Sol, núcleo del tracto Solitario.

5.4.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES AFERENTES BILATERALES A LAS TRES SUBDIVISIONES DEL GRUPO RESPIRATORIO VENTRAL

La inyección bilateral de los fluorocromos azul verdadero y amarillo diamidino marcó las neuronas que, desde los distintos núcleos bulbotuberanciales, envían proyecciones mediante colaterales axónicas a ambos GRVs. Aunque el área de difusión observada tras las inyecciones de azul verdadero fue mayor que tras las de amarillo diamidino, el número de neuronas marcadas, localización y distribución a lo largo del tronco del encéfalo fue similar para ambos fluorescentes. Tampoco se observó ninguna diferencia en cuanto a la distribución de las neuronas doblemente marcadas respecto a las que aparecieron a un lado y otro de la línea media. Así pues, los presentes datos evidencian que ambos fluorocromos poseen propiedades similares de marcaje neuronal retrógrado, resultados que concuerdan con descripciones previas (Horikawa y Powel, 1986) y que constituyen una buena técnica para la demostración de neuronas que proyectan a las diferentes zonas inyectadas mediante colaterales axónicas (Kuypers y col., 1980).

5.4.1.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Complejo de Bötzing

En el presente estudio se encontraron neuronas doblemente marcadas en los núcleos pontinos, parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, y en las dos subdivisiones más caudales del GRV tras inyección bilateral de fluorocromos en el Complejo de Bötzing. En el gato, se demostraron conexiones homolaterales y contralaterales entre el GRV rostral y el Complejo de Bötzing con técnicas electrofisiológicas (Segers y col., 1987) y anatómicas (Takeuchi y col., 1980), y mediante estudios de correlación cruzada (Segers y col., 1985) entre la región de los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse y el Complejo de Bötzing. Sin embargo, no se han caracterizado hasta el momento ningún tipo de neuronas que posean proyecciones bilaterales a la porción más rostral del GRV. Los presentes resultados son los primeros que describen las proyecciones aferentes, tanto simples como bilaterales, al Complejo de Bötzing, en la rata.

5.4.2.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral rostral

En el presente estudio se encontraron neuronas doblemente marcadas en el subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario, los núcleos pontinos, parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, y el Complejo de Bötzingen tras la inyección bilateral en el GRV rostral. La conexión demostrada entre el subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario y el GRV rostral es de una gran importancia, al menos en el gato, para el mantenimiento del sistema generador del ritmo respiratorio (Merrill, 1974; Richter y col., 1979). Estas conexiones también se han observado en la rata (Horst tery col., 1984; Norgren, 1978; Ross y col., 1985; Yamada y col., 1988). Sin embargo, desde el punto de vista electrofisiológico, no se ha puesto de manifiesto un Grupo Respiratorio Dorsal en la rata similar al descrito en el gato (Ezure y col., 1988). Los primeros estudios realizados en la rata sí describieron un Grupo Respiratorio Dorsal, que no ha podido ser corroborado en estudios posteriores (Saether y col., 1987). La presencia de un 1% de neuronas doblemente marcadas en el núcleo ventrolateral del tracto Solitario supone que, en la rata, también existen neuronas que envían proyecciones bilaterales al GRV rostral desde este núcleo, y que podrían estar implicadas en la sincronización de ambos GRV rostrales, tal y como se describió para el gato (Long y Duffin, 1984; Merrill, 1974, 1981). Neuronas con proyección bilateral desde el Complejo de Bötzingen al GRV rostral han sido demostradas anatómicamente en el presente estudio. Este hecho, corrobora los datos obtenidos con técnicas electrofisiológicas en el gato (Bianchi y Barillot, 1982; Merrill, 1982). Las proyecciones axonales desde los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse al GRV rostral están muy bien documentadas, tanto en el gato (Bianchi y St John, 1981; Denavit-Saubié y Riche, 1977) como en la rata (Ellenberger y Feldman, 1990a; Fullwiler y Saper, 1984). Colaterales axónicas desde estas áreas pontinas al GRV rostral sólo se habían demostrado morfológicamente en el gato hasta el presente (Riche y col., 1985).

5.4.3.- Caracterización de las proyecciones aferentes bilaterales al Grupo Respiratorio Ventral caudal

En el presente estudio se encontraron neuronas doblemente marcadas, sólo y exclusivamente, en las dos subdivisiones más rostrales del GRV, tras la inyección bilateral de fluorocromos en el GRV caudal. Dentro del GRV rostral las neuronas se localizaron, preferentemente, en un área que va desde 0,8 a 1 mm rostrales al cero; es decir, de forma similar a la ubicación de las neuronas del GRV rostral que proyectan bilateralmente al Complejo de Bötzing. Este área (0,8 hasta 1,1 mm rostrales al cero) en la rata, ha sido denominada, muy recientemente, Complejo de preBötzing (Smith y col., 1992), donde se concentra la mayor diversidad de las neuronas que forman parte de la red neuronal generadora del patrón respiratorio. En preparaciones *in vitro*, de rodajas de 300 μm de grosor en las coordenadas arriba mencionadas, se logra mantener el patrón respiratorio rítmico en las motoneuronas respiratorias de la rodaja; lo que implica que este área posee todos los tipos neuronales que constituyen el entramado neuronal que genera el ritmo respiratorio. Este área, además, coincide con la zona de transición del GRV rostral al Complejo de Bötzing, donde se encuentran las mayores concentraciones de neuronas con patrón de descarga I-D y E-D y, en menor medida, de neuronas tipo I-A y E-A. El área del preBötzing incluso podría tener neuronas con propiedades marcapasos; aunque este hecho no ha quedado suficientemente demostrado (Smith y col., 1992). En los experimentos presentes se ha hallado que este área del GRV es la que posee una mayor densidad de neuronas con colaterales bilaterales proyectando a otras subdivisiones del GRV (Núñez-Abades, y col., 89b y 90). La mayoría de las neuronas que proyectan con colaterales axónicas al propio GRV podrían ser neuronas I-D o E-D; ya que estos dos tipos de neuronas se caracterizan por poseer numerosísimas colaterales axónicas (Richter y col., 1986). Por otro lado, el que aparecieran neuronas doblemente marcadas en el Complejo de Bötzing es un resultado que concuerda con lo descrito previamente en el gato (Merrill, 1981).

5.4.4.- Consideraciones funcionales

El GRV está organizado como una columna bilateral de neuronas. Los resultados presentes indican que, en la rata, las neuronas que proyectan a las distintas subdivisiones del GRV lo hacen de forma homolateral principalmente. Así pues, en la rata, al igual que ocurre en el conejo y el mono, existe una organización en dos entramados neuronales propiobulbares simétricos y relativamente independientes, cuya sincronización depende de las conexiones que cruzan la línea media (Karczewski y Gromysz, 1982). Lo contrario ocurre en el gato, donde la proyección sobre el GRV es predominantemente contralateral (Portillo, 1986). Por lo tanto, las neuronas con proyecciones bilaterales mediante colaterales axónicas a las subdivisiones del GRV de ambos lados de la línea media podrían ser las encargadas de la sincronización de la actividad de las redes neuronales respiratorias hemibulbares.

5.5.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL

El estudio de las neuronas marcadas retrógradamente tras la inyección del fluorescente en el núcleo frénico reveló que el GRV es la fuente principal de proyecciones a dicho núcleo. Así mismo, la mayoría de las neuronas marcadas con fluorocromo se encontraron en el GRV rostral (Onai y col., 1987b), subdivisión del GRV que contiene predominantemente neuronas inspiratorias (Ellenberger y Feldman, 1990b; Ezure y col., 1988; Saether y col., 1987; Zheng y col., 1991a). Se sabe que las neuronas bulboespinales de este área del GRV establecen conexiones monosinápticas con las motoneuronas frénicas (Ellenberger y Feldman, 1988 y 1990c; Yamada y col., 1988), por lo tanto la demostración aportada por el presente trabajo es un apoyo para los datos electrofisiológicos establecidos previamente.

La segunda subdivisión importante, en número de proyecciones sobre el núcleo frénico, fue el Complejo de Böttinger. Esta subdivisión del GRV es una zona donde predominan las neuronas espiratorias que proveen de entradas inhibitorias a las motoneuronas frénicas (Merrill y Fedorko, 1984; Merrill y col.,

1983). Así pues, al igual que en el gato, en la rata podrían existir dos tipos de poblaciones neuronales que proyectan al núcleo frénico. La primera población extendiéndose desde 1 mm caudal al cero hasta 0,9 mm rostrales al mismo, correspondiente a las neuronas que envían sus axones en igual proporción a ambos lados de la línea media. La segunda población, distribuyéndose rostralmente desde 1 a 1,6 mm rostrales al cero (borde caudal del núcleo facial), compuesta por neuronas con proyección homolateral, principalmente.

Numerosos estudios realizados en el gato (ver Euler, 1986) localizaron, en el bulbo dorsal, otra población de neuronas bulboespinales inspiratorias, ventrolaterales al núcleo del tracto Solitario. La existencia, en la rata, de este grupo neuronal, denominado Grupo Respiratorio Dorsal (Bianchi, 1971; Fedorko y col., 1983) es hoy en día materia de debate para numerosos autores (Ezure y col., 1988; Hilaire y col., 1990; Monteau y Hilaire, 1991; Onai y col., 1987b; Saether y col., 1987; Yamada y col., 1988; Zheng y col., 1991a). Los resultados presentes demostraron que en la rata existe un grupo de neuronas que proyectan al GRV, aunque su importancia numérica sea muy reducida en comparación a la descrita para el gato (Onai y col., 1987b). El papel fisiológico de este área en la rata no se conoce aún.

Se han descrito proyecciones axonales desde los núcleos del rafe, núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse, así como desde las formaciones reticulares bulbares, al núcleo frénico (Holtman y col., 1984; Rikard-Bell y col., 1984). El pequeño número de neuronas marcadas encontradas en los núcleos antes mencionados indica que son fuente de proyección del núcleo frénico de menor importancia que las otras áreas analizadas previamente. El papel fisiológico de estas últimas está aún por dilucidar.

5.5.1.- Consideraciones funcionales

Así pues, el GRV es el área que proyecta en mayor proporción sobre el núcleo frénico en la rata. El núcleo frénico inerva el principal músculo inspiratorio, el diafragma. Esta supremacía de aferencias del GRV se ve reforzada por la poca importancia numérica

de las proyecciones axonales desde el núcleo ventrolateral del tracto Solitario. Esto último, contribuye a que sea discutible la existencia, en la rata, de un Grupo Respiratorio Dorsal con las mismas propiedades funcionales asignadas al descrito en el gato.

5.6.- CARACTERIZACION DE LAS PROYECCIONES EFERENTES BILATERALES A LA MEDULA ESPINAL CERVICAL

Datos anatómicos recientes, basados en la inyección intracelular de peroxidasa de rábano en neuronas bulboespinales inspiratorias del GRV rostral, demostraron que dichas neuronas poseen colaterales axónicas que terminan a ambos lados del bulbo en el gato (Sasaki y col., 1989). Sin embargo, las limitaciones inherentes a esta técnica neuroanatómica no permitió visualizar el sitio de proyección preciso de las colaterales axónicas bilaterales y, por tanto, demostrar si finalmente los axones alcanzaron ambos núcleos frénicos. Resultados similares se obtuvieron en la rata (Zheng y col., 1991b). En el presente trabajo, un 6,5% (rango 2,5-16%) de las neuronas bulboespinales en el GRV rostral exhibieron doble marcaje; lo que implica que estas neuronas envían proyecciones, mediante colaterales axónicas, a ambos núcleos frénicos. Aunque se encontraron algunas neuronas doblemente marcadas en el núcleo del tracto Solitario, como ocurre en el gato (Berger y col., 1984; Otake y col., 1989) y, de forma muy esporádica, en otros núcleos bulboprotuberanciales, la gran mayoría de ellas (90%) se localizaron en el GRV rostral. Sin embargo, la técnica de doble marcaje utilizada en el presente estudio, no dió información sobre si los axones de las neuronas doblemente marcadas cruzaron la línea media en el propio bulbo (Sasaki y col., 1989) o a nivel del núcleo frénico (Goshgarian y col., 1991). El hecho de que las neuronas bulboespinales con colaterales axónicas se encontraron exclusivamente localizadas en el GRV rostral, apoyaría que esta población de neuronas sea diferente a la localizada más rostral en el Complejo de Böttinger, donde no se localizaron neuronas doblemente marcadas. Sin embargo, no existió ninguna evidencia de que la población de neuronas bulboespinales con colaterales axónicas y la población sin colaterales axónicas del GRV rostral constituyeran grupos diferentes de neuronas en función de su localización respecto de las motoneuronas laríngeas del

núcleo Ambiguo. Tampoco los estudios realizados con técnicas electrofisiológicas han puesto de manifiesto la existencia de subpoblaciones diferentes dentro de las neuronas bulboespinales del GRV rostral que proyectan al núcleo frénico (Bianchi, 1971; Feldman y Speck, 1983; Hilaire y col., 1984).

5.6.1.- Consideraciones funcionales

El diafragma, el principal músculo respiratorio, está innervado por los nervios frénicos. Estos nervios reciben exclusivamente axones de las motoneuronas frénicas homolaterales; ya que no hay evidencia de que tales axones crucen la línea media, ni tampoco de que las motoneuronas frénicas posean colaterales axónicas, al menos en la rata (Cameron y col., 1983, Goshgarian y Rafols, 1984). Las neuronas respiratorias bulboespinales son el origen inmediato de la conducción de la información a las motoneuronas frénicas y están localizadas en el bulbo ventrolateral. La transmisión de esta información es vía monosináptica (Ellenberger y Feldman, 1990c; Ellenberger y col., 1990); aunque otras vías polisinápticas también podrían estar implicadas. La producción de movimientos respiratorios sincronizados del conjunto del diafragma, necesario para obtener una correcta ventilación, requiere que la columna bilateral de motoneuronas frénicas reciba la misma información. Puesto que el árbol dendrítico de las motoneuronas frénicas de la rata no cruza la línea media en la médula cervical espinal; es decir, no reciben información de los axones que viajan en el lado contralateral (Furicchia y Goshgarian, 1987). La presencia de un número importante de neuronas bulboespinales en el GRV rostral que proyecten bilateralmente al núcleo frénico podría ser la vía neuroanatómica implicada en la sincronización de la actividad de ambos núcleos frénicos durante la respiración, tos, estornudo, habla u otras funciones.

5.7.- CONSIDERACIONES FUNCIONALES GENERALES

El GRV se encuentra constituido por neuronas propiobulbares, neuronas bulboespinales y por las motoneuronas del núcleo Ambiguo.

Los resultados obtenidos demostraron el alto grado de organización viscerotópica de los distintos grupos de motoneuronas y la disposición en agrupamientos (subnucleares) concretos de las neuronas propiobulbares y bulboespinales del GRV. Así pues, el que los tres tipos de neuronas, propiobulbares, bulboespinales y motoneuronas vagales y glossofaríngeas, presentaran una distribución no homogénea a lo largo del eje rostrocaudal del GRV, podría indicar que el bulbo ventrolateral es una zona con una alta complejidad estructural que estaría implicada no sólo en la respiración, sino también en funciones relacionadas tales como la deglución, vómito o la vocalización. Estas funciones necesitan de una fina coordinación de las neuronas responsables para que el patrón respiratorio se modifique, sin que por ello se altere la tasa ventilatoria. E incluso, en algunas funciones tiene que cambiar el patrón respiratorio de una determinada motoneurona para cumplir otra función (i.e. vómito, tos). A ello ayudaría el gran número de áreas troncoencefálicas que envían proyecciones axonales, de forma diferencial, a las tres subdivisiones morfofuncionales del GRV. Así mismo, el GRV en la rata, por recibir proyecciones desde núcleos relacionados con funciones cardiovasculares, gastrointestinales, nocicepción, etc, también podría ser el área que integra toda esa información con la puramente respiratoria, para adaptar el patrón respiratorio a otros condicionantes fisiológicos.

En comparación con el gran número de núcleos bulboprotuberanciales que proyectan al GRV, fueron muy pocos los que enviaron proyecciones axonales al núcleo frénico. Además, la mayoría de las neuronas marcadas se localizaron dentro de los propios límites del GRV; lo que convierte al bulbo ventrolateral en la fuente principal de entradas premotoras a las motoneuronas frénicas, en parte acrecentado por la débil proyección que presentó el subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario, denominado Grupo Respiratorio Dorsal en el gato. De nuevo este dato le da una particular importancia en la coordinación de la génesis respiratoria al GRV, como fuente principal de entradas al núcleo frénico.

Todas las proyecciones demostradas aquí fueron primordialmente homolaterales. Puesto que la columna de neuronas

respiratorias del GRV y de las motoneuronas frénicas de la médula espinal cervical es bilateral, la existencia de neuronas que proyectan mediante colaterales axónicas a ambos núcleos frénicos o ambos lados del GRV convierte a éstas en vías neuroanatómicas encargadas de la sincronización de ambas redes de neuronas respiratorias. La gran mayoría de dichas neuronas con colaterales se localizaron dentro de los límites del GRV rostral y Complejo de Bötzing. Una vez más, redundando en la gran capacidad, desde el punto de vista morfofuncional, de coordinación que posee el GRV.

En definitiva, estos resultados indican que el GRV es un mosaico complejo de neuronas que podría constituir la base anatómica implicada en las funciones relacionadas con la respiración incluyendo la génesis del propio ritmo respiratorio.

6.- CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados expuestos y de la discusión de los mismos se han obtenido las conclusiones siguientes:

1. El núcleo Ambiguo posee tres subdivisiones morfológicas. La parte caudal del núcleo Ambiguo está constituida por motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente y, dorsales y ventrales a ellas, neuronas parasimpáticas vagales. La subdivisión intermedia está formada por motoneuronas faríngeas vagales y por motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo recurrente, localizadas ventromediales y ventrolaterales respecto de las anteriores. La subdivisión rostral del núcleo Ambiguo está compuesta por motoneuronas esofágicas, y mediales a ellas, motoneuronas faríngeas vagales. En su aspecto coronal, las motoneuronas laríngeas del nervio laríngeo superior se localizan en la porción ventral del núcleo Ambiguo y ventrolateralmente a éstas se disponen las neuronas parasimpáticas vagales y glossofaríngeas. El límite rostral del núcleo Ambiguo se ubica dorsal al núcleo facial, donde se encuentran localizadas las motoneuronas faríngeas del glossofaríngeo, mediales respecto de las motoneuronas esofágicas.

2.- La estructura citoarquitectónica del núcleo Ambiguo demostrada sugiere un alto grado de organización viscerotópica. Así mismo, se ha puesto de manifiesto el alto grado de solapamiento entre las poblaciones de motoneuronas agonistas.

3.- Los árboles dendríticos de las motoneuronas y neuronas parasimpáticas se orientan dorsomedialmente hacia el tracto Solitario, donde terminan los aferentes de los baroreceptores, receptores de estiramiento pulmonar, gustativos, etc. y ventrolateralmente hacia donde se localizan las neuronas propiobulbares y bulboespinales del Grupo Respiratorio Ventral.

4.- Morfológicamente no se ha podido demostrar la existencia de motoneuronas que inerven mediante colaterales axónicas más de un tipo de músculo de las vías aéreas superiores en la rata; ya que no se encontraron motoneuronas doblemente marcadas.

5.- En el Grupo Respiratorio Ventral se localizan neuronas propiobulbares y bulboespinales y motoneuronas del núcleo ambiguo. La distribución de estas tres poblaciones a lo largo del eje rostrocaudal del Grupo Respiratorio Ventral no es homogénea, presentando diferentes agrupaciones subnucleares. La parte caudal del Grupo Respiratorio Ventral se compone de neuronas propiobulbares y bulboespinales solapadas, rodeando a unas pocas motoneuronas vagales. En la parte intermedia, o Grupo Respiratorio Ventral rostral, las poblaciones de neuronas propiobulbares y bulboespinales se sitúan preferentemente ventrolaterales a las motoneuronas del núcleo Ambiguo. Finalmente, en la parte más rostral de la columna (Complejo de Bötzing), el número de motoneuronas vagales y glosofaríngeas es mayor que en las porciones anteriores y, ventrales a ellas, se localizan las neuronas propiobulbares y bulboespinales.

6.- No se ha demostrado la presencia de neuronas doble o triplemente marcadas en el Grupo Respiratorio Ventral; por lo que se concluye que no existen motoneuronas que al mismo tiempo proyecten al bulbo o la médula espinal, o bien neuronas que simultáneamente sean propiobulbares y bulboespinales.

7- Paralelo a la localización diferencial de las neuronas respiratorias en el Grupo Respiratorio Ventral (espiratorias en la zona rostral, inspiratorias en la zona intermedia y espiratorias en la zona caudal) se ha puesto de manifiesto una proyección diferencial desde los distintos núcleos troncoencefálicos a las distintas subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral. Así pues existe:

i) una proyección topográfica desde los subnúcleos del tracto Solitario en el bulbo y desde el núcleo de Kölliker-Fuse en la protuberancia;

ii) una proyección cualitativamente diferencial desde los núcleos del rafe magno y oscuro, que no proyectan al Grupo

Respiratorio Ventral caudal, o desde el área postrema, que no proyecta al Complejo de Bötzingen; y

iii) una proyección cuantitativamente diferencial desde numerosas áreas, por ejemplo el núcleo retrotrapezoide proyecta preferentemente al Grupo Respiratorio Ventral rostral, o el núcleo parabraquial proyecta en mayor proporción al Complejo de Bötzingen.

8.- Los experimentos presentes muestran un elevado número de conexiones recíprocas existentes entre los tres subgrupos del Grupo Respiratorio Ventral, las cuales podrían constituir parte del entramado de neuronas generador del ritmo respiratorio.

9.- El Complejo de Bötzingen es el área con mayor número de neuronas propriobulbares con colaterales axónicas bilaterales a las subdivisiones caudales del Grupo Respiratorio Ventral. También existen neuronas en el Grupo Respiratorio Ventral rostral que proyectan bilateralmente a ambos Grupo Respiratorio Ventral caudales o a ambos Complejos de Bötzingen; la mayor parte de ellas se agrupan en lo que muy recientemente se ha denominado complejo de preBötzingen. Neuronas de los núcleos parabraquial medial y de Kölliker-Fuse de la protuberancia y del subnúcleo ventrolateral del tracto Solitario y Grupo Respiratorio Ventral caudal poseen colaterales axónicas que proyectan bilateralmente a las subdivisiones del Grupo Respiratorio Ventral de ambos lados de la línea media. El papel funcional de estas neuronas podría ser el de la sincronización de la actividad de las redes neuronales respiratorias hemibulbares.

10. El Grupo Respiratorio Ventral es la principal fuente de proyecciones al núcleo frénico. Dentro de esta área parecen existir dos tipos de poblaciones de neuronas bulboespinales proyectando al núcleo frénico. Una primera población, localizada en el Grupo Respiratorio Ventral rostral, correspondiente a las neuronas que envían sus axones en igual proporción a ambos hemibulbos. Una segunda población, ubicada en el Complejo de Bötzingen, constituida por neuronas con proyección principalmente homolateral.

11.- Un alto porcentaje de las neuronas bulboespinales del Grupo Respiratorio Ventral rostral proyectan bilateralmente al núcleo frénico. Estas neuronas podrían constituir la vía neuroanatómica implicada en la sincronización de la actividad de ambos núcleos frénicos durante la respiración, la tos, el estornudo, el habla u otras funciones así mismo relacionadas con la actividad del diafragma.

7.- BIBLIOGRAFIA

Achard, O. y Bucher, V.M., Courants d'action bulbaires à rythme respiratoire, *Hev. Physiol. Pharmac. Acta*, 12 (1954) 265-283.

Agarwall, S.K. y Calaresu, F.R., Reciprocal connections between nucleus tractus solitarii and rostral ventrolateral medulla, *Brain Res.*, 523 (1990) 305-308.

Altschuler, S.M., Bao X., Bieger, D., Hopkins D.A. y Miselis, R.R., Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts, *J. Comp. Neurol.*, 283 (1989) 248-268.

Amoroso, E.C., Bainbridge, J.G., Bell, F.R., Lawn, A.M. y Rosenberg, H., Central respiratory spike potentials, *Nature*, 167 (1951) 603-604.

Andrezick, J.A., Chan-Palay, V. y Palay, S.L., The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology, *Anat. Embryol.*, 161 (1981) 355-371.

Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., Respiration-related neurons in the ventral medulla of newborn rats *in vitro*, *Brain Res. Bull.*, 24 (1990) 599-604.

Arita, H., Kogo, N. y Koshiya, N., Morphology and physiological properties of caudal medullary expiratory neurons of the cat, *Brain Res.*, 401 (1987) 258-266.

Averill, D.B., Cameron, W.E. y Berger A.J., Monosynaptic excitation of dorsal medullary respiratory neurons by slowly adapting pulmonary stretch receptors, *J. Neurophysiol.*, 52 (1984) 771-785.

Averill, D.B., Cameron, W.E. y Berger, A.J., Neural elements subserving pulmonary stretch receptor-mediated facilitation of phrenic motoneurons, *Brain Res.*, 346 (1985) 378-382.

Backman, S.B., Anders, C., Ballantyne, D., Rährig, N., Camerer, H., Mifflin, S., Jordan, D., Dickhaus, H., Spyer, K.M. y Richter, D.W., Evidence for a monosynaptic connection between slowly adapting pulmonary stretch receptor afferents and inspiratory beta neurones, *Pflügers Arch.*, 402 (1984) 129-136.

Ballantyne, D. y Richter, D. W., The functional differences between post-inspiratory and expiratory neurons. En: *Proceedings of the international symposium: central neural production of periodic respiratory movements*, Eds J.L. Feldman y A.J. Berger, Northwestern University, Chicago, 1982, pags. 157-158.

Ballantyne, D. y Richter, D.W., Inhibitory convergence on medullary expiratory neurones. A case for "common inhibitors"?. En: *Neurogenesis of central respiratory rhythm*, Eds. A.L. Bianchi y M. Denavit-Saubie, MTP press limited, Lancaster, 1985, pags. 149-156.

Batsel, H.L., Localization of bulbar respiratory center by microelectrode sounding, *Exp. Neurol.*; 9 (1964) 410-426.

Baumgarten, R. von y Kanzow, E., The interaction of two types of inspiratory neurons in the region of the tractus solitarius of the cat, *Arch. ital. Biol.*, 96 (1958) 361-373.

Baumgarten, R. von, Baumgarten, C. von y Schaefer, K.P., Beitrag zur lokalisationsfrage bulboreticularer respiratorischer neurone de katze, *Pflügers Archiv*, 264 (1957) 217-227.

Bentivoglio, M., Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C. y Dann, O., Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances, *Neurosci. Lett.*, 19 (1980) 25-30.

Berger, A.L., Dorsal respiratory group neurons in the medulla of cat: spinal projections, response to lung inflation and superior laryngeal nerve stimulation, *Brain Res.*, 132 (1977) 231-254.

Berger, A.J., Properties of medullary respiratory neurons, *Fedn. Proc.*, 40 (1981) 2378-2383.

Berger, A.L. y Dick, T.E., Connectivity of slowly adapting pulmonary stretch receptors with dorsal medullary respiratory neurons, *J. Neurophysiol.*, 58 (1987) 1259-1274.

Berger, A.J., Averill, D.B. y Cameron, W.E., Morphology of inspiratory neurons located in the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius of the cat, *J. Comp. Neurol.*, 224 (1984) 60-70.

Bertrand, F. y Hugelin, A., Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms, *J. Neurophysiol.*, 34 (1971) 189-207.

Bertrand, F., Hugelin, A. y Vibert, J.F., Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons, *Exp. Brain Res.*, 16 (1973) 383-399.

Bertrand, F., Hugelin, A. y Vibert, J.F., A stereologic model of pneumotaxic oscillator based on spatial and temporal distributions of neuronal burst, *J. Neurophysiol.*, 37 (1974) 91-107.

Bianchi, A.L., Localisation et étude des neurones respiratoires bulbaires. Mise en jeu antidromique par stimulation spinale ou vagale, *J. Physiol. (Paris)*, 63 (1971) 5-40.

Bianchi, A.L., Modalités de décharge et propriétés anatomo-fonctionnelles des neurones respiratoires bulbaires, *J. Physiol. (Paris)*, 68 (1974) 555-587.

Bianchi, A.L. y St John, W.M., Pontile axonal projections of medullary respiratory neurons, *Resp. Physiol.*, 45 (1981) 167-188.

Bianchi, A.L. y Barillot, J.C., Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: pontile, medullary, spinal and vagal projections, *Neurosci. Lett.*, 31 (1982) 277-282.

Bianchi, A.L. y Grélot, L., Converse motor output of inspiratory bulbospinal premotoneurons during vomiting, *Neurosci. Lett.*, 104 (1989) 298-320.

Bieger, D. y Hopkins, D.A., Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus, *J. Comp. Neurol.*, 262 (1987) 546-562.

Bolser, D.C., Lindsey, B.G. y Shannon, R., Medullary inspiratory activity: influence of intercostal tendon organs and muscle spindle endings, *J. apl. Physiol.*, 62 (1987) 1046-1056.

Bonham, A.C. y McCrimmon, D.R., Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat, *J. Physiol. (Londres)*, 427 (1990) 261-280.

Bowden, E.S. y Duffin, J., Responses of the dorsomedial respiratory neurons of cats to changes in lung volume, *Exp. Neurol.*, 29 (1980) 334-345.

Bystrzycka, E.K., Afferent projections to the dorsal and ventral respiratory nuclei in the medulla oblongata of the cat studied by the horseradish peroxidase technique, *Brain Res.*, 185 (1980) 59-66.

Bystrzycka, E.K. y Nail, B.S., The source of the respiratory drive to nasolabial motoneurons in the rabbit: a HRP study, *Brain Res.*, 266 (1983) 183-191.

Bystrzycka, E.K. y Nail, B.S., Brain stem nuclei associated with respiratory cardiovascular and other autonomic functions. En: *The Rat Nervous System, Vol. 2, Hidbrain and Spinal Cord*, Ed. G. Paxinos, Academic, Sidney, 1985, pags. 95-110.

Cameron, W.E., Averill, D.E. y Berger, A., Morphology of cat phrenic motoneurons as revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 219 (1983) 70-80.

Cohen, M.I., Intrinsic periodicity of the pontile pneumotaxic mechanism, *Am. J. Physiol.*, 195 (1958) 23-27.

Cohen, M.I., Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation, *J. Physiol. (Londres)*, 217 (1971) 133-158.

Cohen, M.I., Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal, *Physiol. Rev.*, 59 (1979) 1105-1173.

Cohen, M.I. y Wang, S.C., Respiratory neuronal activity in pons of cat, *J. Neurophysiol.*, 22 (1959) 33-50.

Cohen, M.I. y Feldman, J.L., Discharge properties of dorsal medullary inspiratory neurons: relation to pulmonary afferents and phrenic efferent discharge, *J. Neurophysiol.*, 51 (1984) 753-776.

Colle, J. y Masion, J., Effect de la stimulation du corte moteur sur l'activité électrique des nerfs phréniques et médians, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 66 (1958) 496-514

Condé, F., Further studies on the use of the fluorescent tracers Fast blue and Diamidino Yellow: effective uptake area and cellular storage sites, *J. Neurosci. Methods*, 21 (1987) 31-43.

Connelly, C.A., Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat?, *Neurosci. Lett.*, 105 (1989) 34-40.

Corde, M., Euler, C. von y Lennerstrand, G., Proprioceptive innervation of the diaphragm, *J. Physiol (Londres)*, 178 (1965) 161-177.

Crouch, J.E., *Text-Atlas of cat anatomy*, Lea Febiger, Filadelfia, 1969, 399 pags.

Chibuzo, G.A. y Cummings, J.F., An enzyme tracer study of the organization of the somatic motor center for the innervation of different muscles of the tongue: evidence for two sources, *J. Comp. Neurol.*, 205 (1982) 273-281.

Davies, R.O. y Kubin, L., Projection of pulmonary rapidly adapting receptors to the medulla of the cat; an antidromic mapping study, *J. Physiol. (Londres)*, 373 (1986) 63-86.

Davis, P.J. y Nail, B.S., On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit, *J. Comp. Neurol.*, 230 (1984) 13-32.

Denavit-Saubié, M. y Riche, D., Descending input from the pneumotaxic system to the lateral respiratory nucleus of the medulla. An anatomical study with the horseradish peroxidase technique, *Neurosci. Lett.*, 6 (1977) 121-126.

Donnelly, D.F., Sica, A.L., Cohen, M.I. y Zhang, H., Dorsal medullary inspiratory neurons: effects of superior laryngeal afferent stimulation, *Brain Res.*, 491 (1989) 243-252.

Donoghue, S., García, M., Jordan, D. y Spyer, K.M., Identification and brain-stem projections of aortic baroreceptor afferent neurones in nodose ganglia of cats and rabbits, *J. Physiol*, 322 (1982a) 337-352.

Donoghue, S., García, M., Jordan, D. y Spyer, K.M., The brainstem projections of pulmonary stretch afferent neurons in cats and rabbits, *J. Physiol. (Londres)*, 322 (1982b) 353-364.

Donoghue, S., Felder, R.B., Jordan, D. y Spyer, K.M., The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study, *J. Physiol. (Londres)*, 347 (1984) 397-409.

Donoghue, S., Felder, R.B., Gilbey, M.P., Jordan, D. y Spyer, K.M., Post-synaptic activity evoked in the nucleus tractus solitarius by carotid sinus and aortic nerve afferents in the cat, *J. Physiol. (Londres)*, 360 (1985) 261-273.

Duron, B., Intercostal and diaphragmatic muscle endings and afferents. En: *Regulation of Breathing*, Ed. T.f. Horbein, Dekker Inc., New York, 1981, pags 473-540.

Duron, B. y Jung-Caillol, M.C., Investigation of afferent activity in the intact phrenic nerve with bipolar electrodes, *Acta neurobiol. exp.*, 33 (1973) 427-432.

Ebbesson, S.O.E., The parcellation theory and its relation to interspecific variability in brain organization, evolutionary and ontogenetic development, and neuronal plasticity, *Cel. Tissue Res.*, 213 (1980) 179-212.

Eccles, R.M., Sears, T.A. y Shealy, C.N., Intracellular recording from respiratory motoneurons of the thoracic spinal cord of the cat, *Nature*, 193 (1962) 844-846.

Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats, *J. Comp. Neurol.*, 269 (1988) 47-57.

Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat, *Brain Res.*, 513 (1990a) 35-42.

Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Subnuclear organization of the lateral tegmental field of the rat. I: Nucleus ambiguus and ventral respiratory group, *J. Comp. Neurol.*, 294 (1990b) 202-211.

Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats, *J. Comp. Neurol.*, 302 (1990c) 707-714.

Ellenberger, H.H., Feldman, J.L. y Goshgarian, H.G., Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections, *J. Comp. Neurol.*, 302 (1990) 707-714.

Euler, C. von, On the central pattern generator for the basic breathing rhythmicity, *J. appl. Physiol.*, 55 (1983) 1647-1659.

Euler, C. von, Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. En: *Handbook of Physiology*, vol.2. *Control of Breathing*, Eds: Cherniack, N.S. and Widdicombe, J.G., *Am. Physiol. Soc.*, 1986, pags. 1-67.

Euler, C. von y Trippenbach, T., Excitability change of the inspiratory "off-switch" mechanism tested by electrical stimulation in nucleus parabrachialis in the cat, *Acta Physiol. Scand.*, 97 (1976) 175-188.

Euler, C. von, Hayward, J.N., Martilla, I. y Wyman, R.J., Respiratory neurones of the ventrolateral nucleus of the solitary tract of the cat: vagal input, spinal connections and morphological identification, *Brain Res.*, 61 (1973) 1-22.

Euler, C. von, Martilla, I., Remmers, J.E. y Trippenbach, T., Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat, *Acta Physiol. Scand.*, 96 (1976) 324-337.

Ezure, K., Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm, *Progr. Neurobiol.*, 35 (1990) 429-450.

Ezure, K. y Manabe, M., Monosynaptic excitation of medullary inspiratory neurons by bulbospinal inspiratory neurons of the ventral respiratory group in the cat, *Exp. Brain Res.*, 74 (1989) 501-511.

Ezure, K., Manabe, M. y Yamada, H., Distribution of medullary respiratory neurons in the rat, *Brain Res.*, 455 (1988) 262-270.

Fedorko, L. y Merrill, E.G., Axonal projections from the rostral expiratory neurons of the Böttinger complex to medulla and spinal cord in the cat, *J. Physiol.*, 350 (1984a) 487-496.

Fedorko, L. y Merrill, E.G., Rhythmic inputs to phrenic and thoracic motoneurons. En: *Proceedings from the International*

Symposium, Neurogenèse du Rythme Respiratoire Central: aspects électrophysiologiques, pharmacologiques et pathologiques, Bandol, France, 18-22 September, 1984b, pags. 54-55.

Fedorko, L., Merrill, E.G. y Lipski, J., Two descending medullary inspiratory pathways to phrenic motoneurons, *Neurosci. Lett.*, 43 (1983) 285-291.

Fedorko, L., Hoskin, R.W. y Duffin, J., Projection from inspiratory neurons of the nucleus retroambigualis to phrenic motoneurons in the cat, *Exp. Neurol.*, 105 (1989) 306-310.

Feldman, J.L., Neurophysiology of breathing in mammals. En: *Handbook of Physiology*, Ed. Bloom, F.E., 1986, pags. 463-524.

Feldman, J.L. y Gautier, H., Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats, *J. Neurophysiol.*, 39 (1976) 31-44.

Feldman, J.L. y Cohen, M.I., Relation between expiratory duration and rostral medullary expiratory neuronal discharge, *Brain Res.*, 141 (1978) 172-178.

Feldman, J.L. y Speck, D.F., Interactions among inspiratory neurons in dorsal and ventral respiratory groups in cat medulla, *J. Neurophysiol.*, 49 (1983) 472-490.

Feldman, J.L. y Ellenberger, H.H., Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals, *Ann. Rev. Physiol.*, 50 (1988) 593-606.

Feldman, J.L., Cohen, M.I. y Wolotsky, P., Powerful inhibition of pontine respiratory neurons by pulmonary afferent activity, *Brain Res.*, 104 (1976) 341-346.

Feldman, J.L., Loewy, A.D. y Speck, D.F., Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study, *J. Neurosci.*, 5 (1985) 1993-200.

Flourens, M.J.P., *Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés*, Ed., J.B. Bailliere, Paris, 1842.

Fullwiler, C.E. y Saper, C.B., Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat, *Brain Res. Rev.*, 7 (1984) 229-259.

Furicchia, J.V. y Goshgarian, H.G., Dendritic organization of phrenic motoneurons in the adult rat, *Exp. Neurol.*, 96 (1987) 621-634.

Gacek, K.E., Localization of laryngeal motoneurons in the kitten, *Laryngoscope*, 85 (1975) 1841-1860.

Gauthier, H., Remmers, J.E. y Bartlett, D.Jr., Control of the duration of expiration, *Res. Physiol.*, 18 (1973) 205-221.

Gesell, R., A neurophysiological interpretation of the respiratory act, *Ergebn. Physiol.*, 43 (1940) 477-639.

Gesell, R. y White, F., Recruitment of muscular activity and the central neurone after-discharge of hyperpnea, *Am. J. Physiol.*, 122 (1938) 48-56.

Gesell, R., Bricker, J. y Magee, C., Structural and functional organization of the central mechanisms controlling breathing, *Am. J. Physiol.*, 117 (1936) 423-452.

González-Barón, S., Bogas, A., Molina, M. y García-Matilla, F., Resistencia de la laringe en relación con estímulos de las vías respiratorias altas, *Rev. esp. Fisiol.*, 34 (1978a) 453-462.

González-Barón, S., Molina, M., Bogas, A.M. y García-Matilla, F., Influencias broncopulmonares sobre la resistencia de la laringe, *Rev. esp. Fisiol.*, 34 (1978b) 463-472.

González-Barón, S., Molina, M., García-Matilla, F. y Alvarez de Toledo, G., Influencias de los nervios laríngeo superior y recurrente en diversas respuestas respiratorias reflejas, *Rev. esp. Fisiol.*, 37 (1981) 211-220.

González-Barón, S., Dawid-Milner, M.S., Lara, J.P., Clavijo, E. y Aguirre, J.A., Cambios de resistencia laríngea y tono bronquial, *Rev. esp. Fisiol.*, 45 Supl (1989) 187-192.

Goshgarian, H.G. y Rafols, J.A., The phrenic nucleus of the albino rat: a correlative HRP and golgi study, *J. Comp. Neurol.*, 201 (1981) 441-456.

Goshgarian, H.G. y Rafols, J.A., The ultrastructure and synaptic architecture of phrenic motor neurons in the spinal cord of the adult rat, *J. Neurocytol.*, 13 (1984) 85-109.

Goshgarian, H.G., Ellenberger, H.H. y Feldman, J.L., Decussation of bulbospinal respiratory axons at the level of the phrenic nuclei in adult rats: a possible substrate for the crossed phrenic phenomenon, *Exp. Neurol.*, 11 (1991) 135-139.

Graham, K. y Duffin, J., Cross-correlation of medullary dorsomedial neurones in the cat, *Exp. Neurol.*, 75 (1982) 627-643.

Graham, K. y Duffin, J., Short-latency interactions among dorsomedial medullary inspiratory neurons in the cat, *Exp. Neurol.*, 88 (1985) 726-741.

Grélot, L., Barillot, J.C. y Bianchi, A.L., Central distributions of the efferent and afferent components of the pharyngeal branches of the vagus and glossopharyngeal nerves: an HRP study in the cat, *Exp. Brain Res.*, 78 (1989a) 327-335.

Grélot, L., Barillot, J.C. y Bianchi, A.L., Pharyngeal motoneurons: respiratory related activity and responses to laryngeal afferents in the decerebrate cat, *Exp. Brain Res.*, 78 (1989b) 336-334.

Guyenet, P.G., Darnall, R.A. y Riley, T.A., Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 259 (1990) 1063-1074.

Hanamori, T. y Smith, D.V., Central projections of the hamster superior laryngeal nerve, *Brain Res. Bull.*, 16 (1986) 271-279.

Hebel, R. y Stromberg, M.W., *Anatomy and Embriology of the laboratory rat*, BioMed Verlag, Wörthsee, 1986, 271 pags.

Hedner, J., Neuropharmacological aspects of central respiratory regulation. An experimental study in the rat, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 542 (1983) 1-109.

Herbert, H., Moga, M.M. y Saper, C.B., Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 293 (1990) 540-580.

Hering, E., Self-steering of respiration through the nervus vagus. En: *Breathing: Hering-Breuer Centenary Symposium*, Ed. R. Porter, Londres, 1970, pags. 359-364..

Hilaire, G. y Monteau, R., Connexions entre les neurones inspiratoires bulbaires et les motoneurones phréniques et intercostaux, *J. Physiol. (Paris)*, 72 (1976) 987-1000.

Hilaire, G., Monteau, R. y Bianchi, A.L., A cross-correlation study of interactions among respiratory neurons of dorsal, ventral and retrofacial groups in cat medulla, *Brain Res.*, 302 (1984) 19-31.

Hilaire, G., Monteau, R., y Errichdi, S., Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by noradrenergic A5 area: an *in vitro* study in the newborn rat, *Brain Res.*, 485 (1989) 325-332.

Hilaire, G., Monteau, R., Gauthier, P., Rega, P. y Morin, D., Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: *in vivo* and *in vitro* studies, *Neurosci. Lett.*, 111 (1990) 133-138.

Hinrichsen, C.F.L. y Ryan, A.T., Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphological evidence for dual innervation?, *Exp. Neurol.*, 74 (1981) 341-355.

Hisa, Y., Nucleus ambiguus motoneurons innervating the canine intrinsic laryngeal muscle by the fluorescent labeling technique, *Exp. Neurol.*, 84 (1984) 441-450.

Holstege, G., Van Neerven, J. y Evertse, F., Spinal cord location of the motoneurons innervating the abdominal, cutaneous maximus, latissimus dorsi and longissimus dorsi muscles in the cat, *Exp. Brain Res.*, 67 (1987) 179-194.

Holtman, J.R.Jr., Norman, W.P. y Gillis, R.A., Projections from the raphe nuclei to the phrenic motor nucleus in the cat, *Neurosci. Lett.*, 44 (1984) 105-111.

Horikawa, K. y Powel, E.W., Comparison of techniques for retrograde labeling using the rat's facial nucleus, *J. Neurosci. Methods*, 17 (1986) 287-296.

Horst ter, G.J., Luiten, P.G.M. y Kuypers, F., Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 11 (1984) 59-75.

Howard, B.R. y Tabatai, M., Localization of the medullary respiratory neurons in rats by microelectrode recording, *J. Appl. Physiol.*, 39 (1975) 812-817.

Hukuhara, T., Neuronal organization of the central respiratory mechanisms in the brainstem of the cat, *Acta Neurobiol. Exp.*, 33 (1973) 219-244.

Hukuhara, T., Nakayama, S. y Okada, H., Action potentials in the normal respiratory centres and its centrifugal pathways in the medulla oblongata and spinal cord, *Jap. J. Physiol.*, 4 (1954) 145-153.

Hyde, T.M. y Miselis, R.R., Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance, *Am. J. Physiol.*, 247 (1984) R173-R182.

Iscoe, S.D., Central Control of the Upper Airway. En: *Respiratory function of the upper airway*, Eds. Mathew, D.P. y Sant' Ambrogio, G., Marcel Dekker, New York, 1988, pags. 125-192.

Jiang, C. y Lipski, J., Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Böttinger complex in the cat, *Exp. Brain Res.*, 81 (1990) 639-648.

Jordan, D. y Spyer, K.M., Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. En: *Progress in Brain Research*, Vol 67, Eds. Cervero, F. y Morrison, J.F.B., Elsevier Science Publisher, 1986, pags. 295-314.

Kahn, N. y Wang, S.C., Pontine pneumotaxic center and central respiratory rhythm, *Am. J. Physiol.*, 211 (1966) 520-524.

Kalia, M., Neuroanatomical organization of the respiratory centers, *Fedn. Proc.*, 36 (1977) 2405-2411.

Kalia, M., Anatomical organization of central respiratory neurons, *Am. Rev. Physiol.*, 43 (1981) 105-120.

Kalia, M. y Mesulam, M.M., Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac and gastrointestinal branches, *J. Comp. Neurol.*, 193 (1980) 467-508.

Kalia, M. y Sullivan, M.J., Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 211 (1982) 248-264.

Kalia, M. y Richter, D.W., Morphology of physiologically identified slowly adapting lung stretch receptor afferents stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the nucleus of the tractus solitarius of the cat. I. A light microscopic analysis, *J. Comp. Neurol.*, 241 (1985a) 503-520.

Kalia, M. y Richter, D.W., Morphology of physiologically identified slowly adapting lung stretch receptor afferents stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the nucleus of the tractus solitarius of the cat. II. An ultrastructural analysis, *J. Comp. Neurol.*, 241 (1985b) 521-535.

Kalia, M. y Richter, D.W., Rapidly adapting pulmonary receptor afferents: I. Arborization in the nucleus of the tractus solitarius, *J. Comp. Neurol.*, 274 (1988a) 560-573.

Kalia, M. y Richter, D.W., Rapidly adapting pulmonary receptor afferents: II. Fine structure and synaptic organization of the central terminal processes in the nucleus of the tractus solitarius, *J. Comp. Neurol.*, 274 (1988b) 574-594.

Kalia, M., Feldman, J.L. y Cohen, M.I., Afferent projection to the inspiratory neuronal region of the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius in the cat, *Brain Res.*, 171 (1979) 135-141.

Karczewski, W.A. y Gromysz, H., The significance of species differences in respiratory neurophysiology- the split-brainstem preparation, *Experient.*, 38 (1982) 826-827.

Keizer, K., Kuypers, H.G.J.M., Huisman, A.M. y Dann, D., Diamidino Yellow dihydrochloride (DY-2HC1): a new fluorescent retrograde neuronal tracer, which migrates only very slowly out of the cell, *Exp. Brain Res.*, 51 (1983) 179-191.

Keller, J.T., Saunders, M.C., van Loveren, H. y Shipley, M.T., Neuroanatomical considerations of palatal muscles: tensor and levator veli palatini, *Cleft Palate J.*, 21 (1984) 70-75.

King, G.W., Topology of ascending brainstem projections to nucleus parabrachialis in the cat, *J. Comp. Neurol.*, 191 (1980) 615-638.

Kirkwood, P.A. y Sears, T.A., Monosynaptic excitation of thoracic expiratory motoneurons from lateral respiratory neurons in the medulla of the cat, *J. Physiol. (Londres)*, 234 (1973) 87P-89P.

Knox, C.K. y King, G.W., Changes in the Breuer-Hering reflexes following rostral pontine lesion, *Respir. Physiol.*, 28 (1976) 189-206.

Krammer, E.B., Rath, T. y Lischka, M.F., Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus: a HRP study in the rat, *Brain Res.*, 170 (1979) 533-537.

Kubin, L. y Davies, R.O., Sites of termination and relay of pulmonary rapidly adapting receptors as studied by spike-triggered averaging, *Brain Res.*, 443 (1988) 215-221.

Kuypers, H.G.J.M., Bentivoglio, M., Castman-Berrevoets, C.E. y Bharos, A.T., Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cell, *Exp. Brain Res.*, 40 (1980) 383-392.

Kuzuhara, S. y Chou, S.M., Localization of the phrenic nucleus in the rat: a HRP study, *Neurosci. Lett.*, 16 (1980) 119-124.

Lagercrantz, H., Classical and "new" transmitters during development—some examples from control of respiration, *J. Devl. Physiol.*, 6 (1984) 193-205.

Larnicol, L., Rose, D., Marlot, D. y Duron, B., Anatomical organization of cat intercostal motor nuclei as demonstrated by HRP retrograde labelling, *J. Physiol. (Paris)*, 78 (1982) 198-206.

Lawn, A.M., The localization in the nucleus ambiguus of the rabbit, of the cells of origin of motor nerve fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration, *J. Comp. Neurol.*, 127 (1966a) 293-306.

Lawn, A.M., The nucleus ambiguus of the rabbit, *J. Comp. Neurol.*, 127 (1966b) 307-319.

LeGallois, J.J.C., *Expériences sur le principe de la vie*, D'Hautel, Paris, 1812.

Lipski, J. y Merrill, E.G., Electrophysiological demonstration of the projection from expiratory neurones in rostral medulla to contralateral dorsal respiratory group, *Brain Res.*, 197 (1980) 521-524.

Lipski, J. y Merrill, E.G., Inputs to intercostal motoneurons from ventrolateral medullary respiratory neurones in Nembutal-anaesthetized cats, *J. Physiol. (Londres)*, 339 (1983) 25P-26P.

Lipski, J. y Duffin, J., Monosynaptic excitation of thoracic inspiratory motoneurons by inspiratory neurons of the nucleus tractus solitarius in the cat. En: *Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society*, Vol. 16(2) (1985) 246P.

Lipski, J. y Martin-Body, R.L., Morphological properties of respiratory intercostal motoneurons in cats as revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 260 (1987) 423-434.

Lipski, J., Trzebski, A. y Kubin, L., Excitability changes of dorsal inspiratory neurons during lung inflation as studied by measurement of antidromic invasion latencies, *Brain Res.*, 161 (1979) 25-38.

Lipski, J., Kubin, L. y Jodkowski, J., Synaptic action of R β neurons on phrenic motoneurons studied with spike-triggered averaging, *Brain Res.*, 288 (1983) 105-118.

Lobera, B., Pásaro, R., González-Barón, S. y Delgado-García, J.M., A morphological study of ambiguous nucleus motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rat and cat, *Neurosci. Lett.*, 23 (1981) 125-130.

Long, S.E. y Duffin, J., The medullary respiratory neurons: a review, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 62 (1984) 161-182.

Long, S.E. y Duffin, J., The neuronal determinants of respiratory rhythm, *Prog. Neurobiol.*, 27 (1986) 101-182.

Loveren, H. van, Saunders, M.C. y Keller, J.T., Localization of motoneurons innervating the levator veli palatini muscle in the cat, *Brain Res. Bull.*, 11 (1983) 303-307.

Loveren, H. van, Saunders, M.C., Cassini, P. y Keller, J.T., Localization of motoneurons innervating the stylopharyngeus muscle in the cat, *Neurosci. Lett.*, 58 (1985) 251-255.

Lowe, A.A., Excitatory and inhibitory inputs to hypoglossal motoneurons and adjacent reticular formation neurons in cats, *Exp. Neurol.*, 62 (1978) 30-47.

Lumsden, T., Observations on the respiratory centers in the cat, *J. Physiol. (Londres)*, 57 (1922a) 153-160.

Lumsden, T., Observations on the respiratory centers, *J. Physiol. (Londres)*, 57 (1922b) 354-367.

Lumsden, T., The regulation of respiration part I, *J. Physiol. (Londres)*, 58 (1923a) 81-91.

Lumsden, T., The regulation of respiration part II, *J. Physiol. (Londres)*, 58 (1923b) 11-126.

Markwald, M., The movements of respiration, Blackie and Son, Londres, 1988.

Mead, J., How the respiratory pump works. En: *Proceedings of the International Symposium: Central Neural Production of Periodic Respiratory Movements*, Eds. Feldman, J.L. and Berger, A.J., Northwestern University, Department of Physiology, Chicago, 1982, pags. 5-7.

Megirian, D., Pollard, M.J. y Sherrey, J.H., The labile respiratory activity of rib cage muscles of the rat during sleep, *J. Physiol. (Londres)*, 389 (1987) 99-110.

Merrill, E.G., The lateral respiratory neurons of the medulla: their associations with the nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord, *Brain Res.*, 24 (1970) 11-28.

Merrill, E.G., Interactions between medullary respiratory neurones in the cat, *J. Physiol. (Londres)*, 226 (1972) 72P.

Merrill, E.G., Finding a respiratory function for the medullary respiratory neurons. En: *Essays on the Nervous System*, Eds. Bellairs, E. y Gray, E.G., Clarendon Press, Oxford, 1974, pags. 451-486.

Merrill, E.G., Is there reciprocal inhibition between medullary inspiratory and expiratory neurones. En: *Central nervous control mechanisms in breathing*, Eds Euler von, C. y Lagercrantz, H., Pergamon, Oxford, 1979, pp. 239-254..

Merrill, E.G., Where are the real respiratory neurons?. *Fed. Proc.* 40 (1981) 2389-2394.

Merrill, E.G., Network properties of respiratory neurones. En: *Central Neural Productions of Periodic Respiratory Movements*, Eds. Feldman, J.L. y Berger, A.J., Proceedings of the International Symposium, Northwestern University, Chicago, 1982, pags. 54-55.

Merrill, E.G. y Fedorko, L., Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending projection from Bötzing neurons, *J. Neurosci.*, 4 (1984) 2350-2353.

Merrill, E.G., Lipski, J., Kubin, L. y Fedorko, L., Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones, *Brain Res.*, 263 (1983) 43-50.

Miller, A.D., Localization of motoneurones innervating individual abdominal muscles of the cat, *J. Comp. Neurol.*, 256 (1987) 600-606.

Miller, A.D., Tan, L.K. y Suzuki, I., Control of abdominal and expiratory intercostal muscle activity during vomiting: role of ventral respiratory group expiratory neurons, *J. Neurophysiol.*, 57 (1987) 1854-1866.

Mitchell, R.A. y Berger, A.J., Neural regulation of respiration, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 111 (1975) 206-224.

Miyazaki, T., Yoshida, Y., Hirano, M., Shin, T. y Kanaseki, T., Central location of the motoneurons supplying the thyrohyoid and the geniohyoid muscles as demonstrated by horseradish peroxidase method, *Brain Res.*, 219 (1981) 423-427.

Monteau, R. y Hilaire, G., Spinal respiratory motoneurons, *Progr. Neurobiol.*, 37 (1991) 83-144.

Ngai, S. H. y Wang, S.C., Organization of central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat: Localization by stimulation and destruction, *Am. J. Physiol.*, 190 (1957) 343-349.

Nomura, S. y Mizuno, N., Central distribution of afferent and efferent components of the glossopharyngeal nerve: an HRP study in the cat, *Brain Res.*, 236 (1982) 1-13.

Norgren, R., Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat, *Neurosci.*, 3 (1978) 207-218.

Núñez-Abades, P.A., Portillo, F. y Pásaro, R., Estudio comparado de las proyecciones aferentes desde los núcleos del tronco del encéfalo relacionados con la respiración a los núcleos retrofacial, ambiguo y retroambiguo en rata y gato, mediante el transporte retrogrado de fluorocromos, En: *Acta IX Bienal de la RSEHN, Univ. de Sevilla, Sevilla, 1989a*, 355-364.

Núñez-Abades, P.A., Portillo, F y Pásaro, R., Characterization of axonal afferent projections to the nuclei ambiguus and retrofacialis from brainstem respiratory related nuclei in the rat. A retrograde fluorescent tracers study, *Pflügers Archiv*, 414 (1989b) S5.

Núñez-Abades, P.A., Portillo, F. y Pásaro, R., Characterisation of afferent projections to the nucleus ambiguus of the rat, by means of fluorescent double labelling, *J. Anat. (Londres)*, 172 (1990) 1-15.

Núñez-Abades, P.A., Pásaro, R. y Bianchi, A.L., Localization of respiratory bulbospinal and propiobulbar neurons in the region of the nucleus ambiguus of the rat, *Brain Res.*, 568 (1991a) 165-172.

Núñez-Abades, P.A., Spielmann, J.M. y Cameron, W.E., Repetitive firing properties of developing rat genioglossal motoneurons. En: *Neural nets and Rhythms in vertebrates and invertebrates*, Arcachon, 1991b, P4.

Núñez-Abades, P.A., Pásaro, R. y Bianchi, A.L., Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by means of four different fluorochromes, *Neurosci. Lett.*, 135 (1992a) 103-107.

Núñez-Abades, P.A., Spielmann, J.M. y Cameron, W.E., Postnatal changes in specific membrane resistance of rat brainstem motoneurons, *Society for Neuroscience*, 1992b.

Olszewski, J. y Baxter, D., *Cytoarchitecture of the human brain stem*, Lippincott, Philadelphia, 1954, 144 pags.

Onai, T., Saji, M. y Miura, M., Functional subdivisions of the nucleus tractus solitarii of the rat as determined by circulatory and respiratory responses to electrical stimulation of the nucleus, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 21 (1987a) 195-202.

Onai, T., Saji, M. y Miura, M., Projections of supraspinal structures to the phrenic motor nucleus in rats studied by a horseradish peroxidase microinjection method, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 21 (1987b) 233-239.

Ondina, D.M., Yamamoto, W.S. y Masland, W.S., Respiratory centers of the albino rat, *Amer. J. Physiol.*, 198 (1960) 389-392.

Orem, J., Netick, A. y Dement, W.C., Breathing during sleep and wakefulness in the cat, *Respir. Physiol.*, 30 (1977) 265-289.

Otake, K., Sasaki, H., Ezure, K. y Manabe, M., Axonal projections from Bötzinger expiratory neurons to contralateral ventral and dorsal respiratory groups in the cat, *Exp. Brain Res.*, 72 (1988) 167-177.

Pásaro, R., Lobera, B., González-Barón, S. y Delgado-García, J.M., Localización de las motoneuronas de los músculos intrínsecos de la laringe en la rata, *Rev. Esp. Fisiol.*, 37 (1981) 317-322.

Pásaro, R., Lobera, B., González-Barón, S. y Delgado-García, J.M., Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat, *Exp. Neurol.*, 82 (1983) 623-634.

Paxinos, G., *The rat nervous system*, Academic, Sydney, 1985.

Paxinos, G. y Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2 ed., Academic, Sidney, 1986.

Pearce, R.A., Stornetta, R.L. y Guyenet, P.G., *Retrotapezoid nucleus in the rat*, *Neurosci. Lett.*, 101 (1989) 138-142.

Pitts, R.F., *Organization of the respiratory centre*, *Physiol. Rev.*, 26 (1946) 609-630.

Pitts, R.F., Magoun, H.W. y Ranson, S.W., *Localization of the medullary respiratory centers in the cat*, *Am. J. Physiol.*, 126 (1939a) 637-688.

Pitts, R.F., Magoun, H.W. y Ranson, S.W., *Interrelations of the respiratory centers in the cat*, *Am. J. Physiol.*, 126 (1939b) 689-707.

Pitts, R.F., Magoun, H.W. y Ranson, S.W., *The origin of respiratory rhythmicity*, *Am. J. Physiol.*, 127 (1939c) 654-670.

Portillo, F., *Conexiones entre áreas respiratorias del sistema nervioso mediante técnica de marcaje neuronal múltiple*, Universidad de Sevilla, Sevilla, 1986, 255 pags.

Portillo, F. y Pásaro, R., *Location of bulbospinal neurons and of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the rat and cat by means of retrograde fluorescent labelling*, *J. Anat.*, 159 (1988a) 11-18.

Portillo, F. y Pásaro, R., *Location of motoneurons supplying the intrinsic laryngeal muscles of rats by means of horseradish peroxidase and fluorescent double-labeling study*, *Brain Behav. Evol.*, 32 (1988b) 220-225.

Prabhakar, N.R., Mitra, J., Overholt, J.L. y Chernicack, N.S., *Analysis of postinspiratory activity of phrenic motoneurons with chemical and vagal reflexes*, *J. Appl. Physiol.*, 61 (1986) 1499-1509.

Remmers, J.E., Bartlett, D. y Putnam, M.D., *Changes in respiratory cycle associated with sleep*, *Resp. Physiol.*, 28 (1976) 227-238.

Richard, C.A. y Stremel, R.W., *Involvement of the raphe in the respiratory effect of gigantocellular area activation*, *Brain Res. Bull.*, 25 (1990) 19-23.

Richard, C.A., Waldrop, T.G., Bauer, R.B., Mitchell, J.P. y Stremel, R.W., *The nucleus gigantocellularis modulates the cardiopulmonary responses to central and peripheral drives related to exercise*, *Brain Res.*, 482 (1989) 49-56.

Riche, D., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., Interconnections between central respiratory nuclei in the cat. An ultrastructural study, En: **Neurogenesis of Central Respiratory Rhythm**, Eds. Bianchi A.L. y Denavit-Saubié, M., Lancaster, MTP Press, 1985, pags. 145-148.

Richter, D.W., Generation and maintenance of the respiratory rhythm, *J. Exp. Biol.*, 100 (1982) 93-107.

Richter, D.W. y Sellar, H., Baroreceptor effects on medullary respiratory neurones of the cat, *Brain Res.*, 86 (1975) 168-171.

Richter, D.W. y Ballantyne, D., Central rhythm generation by inspiratory neurones in the anaesthetized cat, *Neurosci. Lett. Suppl.*, 7 (1981) S117.

Richter, D.W. y Ballantyne, D., A three phase theory about the basic respiratory pattern generator, En: **General neurone environment and the control systems of breathing and circulation**, Eds. Schlafke, M.E., Koepchen, H.P. y See, W.R. Springer-Verlag, Berlin, 1983, pags. 164-174.

Richter, D.W., Camerer, H., Meesmann, M. y Röhrig, N., Studies on the synaptic interconnection between bulbar respiratory neurones of cats, *Pflügers Archiv*, 380 (1979) 245-257.

Richter, D.W., Ballantyne, D. y Remmers, J.E., How is the respiratory rhythm generated?. A model, *News Physiol. Sci.*, 1 (1986) 109-112.

Rikard-Bell, G.C., Bystrzycka, E.K. y Nail, B.S., Brainstem projections to the phrenic nucleus; an HRP study in the cat, *Brain Res. Bull.*, 12 (1984) 469-477.

Rikard-Bell, G.C., Bystrzycka, E.K. y Nail, B.S., The identification of brainstem neurones projecting to the thoracic respiratory motoneurones in the cat as demonstrated by retrograde transport of HRP, *Brain Res. Bull.*, 14 (1985) 25-37.

Ross, C.A., Ruggiero, D.A. y Reis, D.J., Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla, *J. Comp. Neurol.*, 242 (1985) 511-534.

Saether, K., Hilaire, G. y Monteau, R., Dorsal and ventral respiratory groups of neurons in the medulla of the rat, *Brain Res.*, 419 (1987) 87-96.

Saji, M. y Miura, M., Thoracic expiratory motor neurons of the rat: localization and sites of origin of their premotor neurons, *Brain Res.*, 507 (1990) 247-253.

Sant'Ambrogio, G., Wilson, M.F. y Frazier, D.T., Somatic afferent activity in reflex regulation of diaphragmatic function in the cat, *J. Appl. Physiol.*, 17 (1962) 829-832.

Sant'Ambrogio, G., Frazier, D.T., Wilson, M.F. y Agostini, E., Motor innervation and pattern of activity of cat diaphragm, *J. Appl. Physiol.*, 18 (1963) 43-46.

Sasaki, H., Otake, K., Mannen, H., Ezure, K. y Manabe, M., Morphology of augmenting inspiratory neurons of the ventral respiratory group in the cat, *J. Comp. Neurol.*, 282 (1989) 157-168.

Schmued, L.C. y Fallon, J.M., Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties, *Brain Res.*, 377 (1986) 147-154.

Schweizer, H., Ruebsae, R. y Ruehle, C., Localization of brain stem motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rufous horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*, *Brain Res.*, 230 (1981) 41-50.

Sears, T.A., The respiratory motoneurons and apneusis, *Fedn. Proc.*, 36 (1977) 2412-2420.

Sears, T.A., Kirkwood, P.A. y Davies, J.G., Cross-correlation analysis of connections between bulbospinal neurones and respiratory motoneurons. En: *Neurogenesis of central respiratory rhythm*, Eds. Bianchi, A.L. y Denavit-Saubie, M., MTP Press Limited, Lancaster, 1985, pags. 216-222.

Segers, L.S., Shannon, R. y Lindsey, B.G., Interactions between rostral pontine and ventral medullary respiratory neurons, *J. Neurol.*, 54 (1985) 318-334.

Segers, L.S., Shannon, R., Saporta, S. y Lindsey, B.G., Functional associations among simultaneously monitored lateral medullary respiratory neurons in the cat. I. Evidence for excitatory and inhibitory actions of inspiratory neurons, *J. Neurophysiol.*, 57 (1987) 1078-1100.

Sessle, B.J., Ball, G.J. y Lucier, G.E., Suppressive influences from periaqueductal grey and nucleus raphe magnus on respiration and related reflex activities and on solitary tract neurons, and effect of naloxone, *Brain Res.*, 216 (1981) 145-161.

Shannon, R., Intercostal and abdominal muscle afferent influence on medullary dorsal respiratory group neurons, *Respir. Physiol.*, 39 (1980) 73-94.

Shannon, R. y Lindsey, B.G., Expiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: inhibitory effects of intercostal tendon organs, *Expl. Neurol.*, 97 (1987) 730-734.

Shannon, R., Bolser, D.C. y Lindsey, B., Medullary expiratory activity: influence of intercostal tendon organs and muscle spindle endings, *J. Appl. Physiol.*, 62 (1987) 1057-1062.

Sieck, G.C. y Harper, R.M., Pneumotaxic area neuronal discharge during sleep-waking states in the cat, *Exp. Neurol.* 67

(1980) 79-102.

Sieck, G.C. y Harper, R.M., Absence of high-frequency oscillations in the discharge of pneumotoxic neurons in intact, unanaesthetized cats, *Brain Res.*, 221 (1981) 397-401.

Skirboll, L., Hokfelt, T., Norell, G., Phillipson, O., Kuypers, H.G.J.M., Bentivoglio, M., Catsman-Berrevoets, A.C., Goldstein, M. y Brownstein, M., A method for specific transmitter identification of retrogradely labeled neurons: immunofluorescence combined with fluorescence tracing, *Brain Res. Rev.*, 8 (1984) 99-127.

Smith, J.C., Morrison, D.E., Ellenberger, H.H., Otto, M.R. y Feldman, J.L., Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat, *J. Comp. Neurol.*, 281 (1989) 69-96.

Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., y Feldman, J.L., Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals, *Science*, 254 (1992) 726-729.

St. John, W. M., Independent, bilateral sites for ventilatory neurogenesis, En: *Proceedings of the international symposium: central neural production of periodic respiratory movements*, Eds. Feldman, J.L. and Berger, A.J., Northwestern University, Chicago, 1982, pags. 167-169.

St. John, W.M. y Wang, S.C., Response of medullary respiratory neurons to hypercapnia and isocapnic hypoxia, *J. Appl. Physiol.*, 43 (1977) 812-822.

St. John, W.M., Glasser, R.L. y King, R., Rhythmic respiration in awake vagotomized cats with chronic pneumotoxic area lesions, *Respir. Physiol.*, 15 (1972) 233-244.

Staub, N.C., *Basic respiratory physiology*, Churchill Livingstone, Nueva York, 1991, 242 pags.

Stremel, R.W., Waldrop, T.G., Richard, C.A. y Iwamoto, G.A., Cardiorespiratory responses to stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis, *Brain Res., Bull.* 24 (1990) 1-6.

Suzue, T., Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat, *J. Physiol. (Londres)*, 354 (1984) 173-183.

Takagi, K. y Nakayama, T., Respiratory discharge of the pons, *Science*, 128 (1958) 1206.

Takeuchi, Y., Uemura, M., Matsuda, K., Matsushima, R. y Mizuno, N., Parabrachial nucleus neurons projecting to the lower brain stem and the spinal cord. A study in the cat by the

Fink-Heimer and the horseradish peroxidase methods, *Exp. Neurol.*, 70 (1980) 403-413.

Thanos, S. y Bonhoeffer, F., Investigations on the development and topographic order of retino-tectal axons: anterograde and retrograde staining of axons and perikarya with rhodamine in vivo, *J. Comp. Neurol.*, 219 (1983) 420-430.

Uemura, M., Matsuda, K., Kume, M., Takeuchi, Y., Matsushima, R. y Mizuno, H., Topographical arrangement of hypoglossal motoneurons: an HRP study in the cat, *Neurosci. Lett.*, 13 (1979) 99-104.

Uemura-Sumi, M., Mizuno, H., Nomura, S., Iwahori, M., Takeuchi, Y. y Matsushima, R., Topographical representation of the hypoglossal nerve branches and tongue muscles in the hypoglossal nucleus of macaque monkeys, *Neurosci. Lett.*, 22 (1981) 31-35.

Wallach, J.H., Rybicki, K.J. y Kaufman, M.P., Anatomical localization of the cells of origin of efferent fibers in the superior laryngeal and recurrent laryngeal nerves of dogs, *Brain Res.*, 261 (1983) 307-311.

Wang, S.C., Ngai, S.H. y Frumin, M.J., Organization of central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat: Genesis of normal respiratory rhythmicity, *Am. J. Physiol.*, 190 (1957) 333-342.

Webber, C.L., Wurster, R.D. y Chung, J.M., Cat phrenic nucleus architecture as revealed by horseradish peroxidase mapping, *Expl. Brain Res.*, 35 (1979) 395-406.

Yamada, H., Ezure, K. y Manabe, M., Efferent projections of inspiratory neurons of the ventral respiratory group. A dual labeling study in the rat, *Brain Res.*, 455 (1988) 283-294.

Yayima, Y. y Hayashi, Y., Electrophysiological evidence for axonal branching of ambiguous laryngeal motoneurons, *Brain Res.*, 478 (1989) 309-314.

Yoshida, Y., Miyazaki, T., Hirano, M., Shin, T., Totodi, T. y Kanaseki, T., Location of motoneurons supplying the cricopharyngeal muscle in the cat studied by means of the horseradish peroxidase method, *Neurosci. Lett.*, 18 (1980) 1-4.

Yoshida, Y., Miyazaki, T., Hirano, M., Shin, T., Totodi, T. y Kanaseki, T., Localization of efferent neurons innervating the pharyngeal constrictor muscles and the cervical esophagus muscles in the cat by means of the horseradish peroxidase method, *Neurosci. Lett.*, 22 (1981) 91-95.

Yoshida, Y., Miyazaki, T., Hirano, M., Shin, T., T. y Kanaseki, T., Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats and demonstrated by horseradish peroxidase, *Acta*

Otolaryngol, (Estocolmo), 94 (1982) 329-334.

Yoshida, Y., Mitsumasu, T., Miyazaki, T., Hirano, M. y Kanaseki, T., Distribution of motoneurons in the brain stem of monkeys, innervating the larynx, Brain Res. Bull., 13 (1984) 413-419.

Yoshida, Y., Mitsumasu, T., Hirano, M. y Kanaseki, T., Somatotopic representation of the laryngeal motoneurons in the medulla of monkeys, Acta Otolaryngol, (Estocolmo), 100 (1985) 299-303.

Zheng, Y., Barillot, J.C. y Bianchi, A.L., Patterns of membrane potentials and distributions of the medullary respiratory neurons in the decerebrate rat, Brain Res., 546 (1991a) 261-270.

Zheng, Y., Barillot, J.C. y Bianchi, A.L., Bulbospinal respiratory neurons in decerebrate rats, III IBRO congress (1991b) F18.2.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

PEDRO NÚÑEZ ABADES
ORGANIZACION NEURONAL DEL GRUPO RESPIRATORIO
VENTRAL EN LA RATA

APTO CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

9

JULIO

92

[Signature]

~~*[Signature]*~~

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500594895

FBI E TD-289

594895