



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
DE CASTILLA Y LEÓN (INCYL)**

Características morfofuncionales del reflejo auricular desencadenado por estímulos acústicos

Tesis Doctoral

José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Directora: M^a Dolores E. López García

Salamanca - España

2008



Universidad de Salamanca

Dpto. de Biología Celular y Patología
Facultad de Medicina
Alfonso X El Sabio s/n. 37007. Salamanca
Tel. 34-923-294400 Ext. 1865
FAX: 34-923-294549/ 34-923-294730

M^a Dolores E. López García, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular y Patología e investigadora del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Características morfofuncionales del reflejo auricular desencadenado por estímulos acústicos”, ha sido realizado bajo mi dirección por D. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior en el Laboratorio de Neurobiología de la Audición de la Universidad de Salamanca, y considero que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 17 de junio de 2008.

Fdo: M^a Dolores E. López García.

Para la planificación, realización y redacción de este trabajo de investigación hemos obtenido financiación de diversas instituciones a las cuales agradecemos: Agencia Española de Cooperación Internacional AECI), Ministerio de Educación y Ciencia (PROFIT: CIT-390000-2005-4, BFU2006-00811 y BFU2007-65210), Junta de Castilla y León (JCyL-FSE: SA-007C05), Secretaría de Estado de Universidades e Investigación (SB 2005-0074). *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP 00/06966-4), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – CNPQ 202535/2006-1.

A mi esposa Rosângela y a mi hijo José Gabriel.

*Puertos seguros donde siempre encuentro apoyo,
cariño y fuente renovable de motivación*

AGRADECIMENTOS

En el momento que escribo estas líneas, hago una reflexión y me acuerdo de todas las etapas que llevarán a la finalización de este trabajo: planificación, realización de experimentos, análisis de resultados y redacción. Esta tesis me ha hecho aprender mucho más que Neurociencia, y ha coexistido con momentos cruciales en mi vida profesional y personal: mi boda, la oposición en la Universidad, el cambio de país y luego de ciudad en mi país y el nacimiento de mi hijo José Gabriel. Es notable la participación de muchas personas aunque natural, ya que poco podemos hacer solos. A todas estas personas soy grato y a algunas de ellas quiero dedicar un agradecimiento especial.

A la Dra. M^a Dolores E. López García, por la concepción del proyecto, incentivo constante, paciencia, orientación y amistad. La Dra. López siempre ha estado presente durante este trabajo, a veces desde el otro lado del océano. Sin su apoyo e incentivo esta tesis no sería posible. Quisiera agradecerle su constante preocupación humana conmigo y mi familia, apoyo muy importante sobre todo cuando estamos alejados de nuestros orígenes. Con ella he aprendido ciencia, pero más que eso, he aprendido mucho de relaciones humanas y creo que, además de agradecerle por haber abierto un sendero científico, le agradezco por haber permitido la apertura de mis horizontes.

Al Dr. Manuel Sánchez Malmierca, por la oportunidad y auxilio en la realización de los experimentos de electrofisiología, orientación en el trabajo tutelado, discusión de los resultados y por su enseñanza sobre el pragmatismo.

Al Dr. Miguel A. Merchán Cifuentes Director del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, además del Laboratorio de Neurobiología de la Audición, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, recepción siempre fraterna y apoyo en todo el que a él fue solicitado.

A Inácio Plaza López, también conocido por Nacho, por todo su apoyo en cuestiones profesionales técnicas, las cuales me ha enseñado con maestría. Además, quisiera agradecerle por su amistad y la de su familia, de la cual mi familia y yo hemos disfrutado. Gracias por tu mirada humana y tu preocupación por el bienestar de los demás.

Al Dr. Antonio Jesús Álvarez Morujo Suárez, por su auxilio en el análisis del material al microscopio electrónico de transmisión, su disponibilidad y trato siempre amable.

Al Dr. Jackson Cioni Bittencourt, por la recepción fraterna en el período que estuve en su laboratorio, incentivo, confianza depositada en mi capacidad de trabajo y auxilio para realización de parte de los experimentos y revisión de versiones preliminares del texto.

Al Dr. Enrique López Poveda por el auxilio en la estandarización de la técnica de densitometría óptica, compañerismo y discusión sobre temas universitarios (enseñanza e investigación).

Al Dr. Enrique Saldaña, por el apoyo e la discusión de temas científicos, trato amigable y disponibilidad para ayudar en lo que fuera necesario.

Al Dr. Oisenyl José Tamega, por la confianza en mi capacidad de trabajo y apoyo institucional para la realización de mis estancias de investigación en la Universidad de Salamanca.

Al Dr. Roelf J. Cruz Rizzolo por su apoyo en la solicitud de las becas de corta duración de la AECI y consejos siempre útiles. Quisiera agradecerle también por su incentivo para que yo ampliara mi visión científica y personal.

A los antiguos y actuales compañeros del Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Olga, Antonio, Lucho, Peteco, Orlando, Marco, Richard, Virginia, Melissa, Cheryl, Mohamed, Flora, Salvatore, Almudena y Peter; por el espíritu de compañerismo, convivencia profesional armoniosa y momentos alegres que hemos disfrutado.

A los docentes del Departamento de Anatomía del *Instituto de Biociências – Botucatu – UNESP* por el apoyo y permiso para realización de las instancias de investigación en la Universidad de Salamanca.

Al Dr. Luis Muñoz, director del servicio de experimentación animal y demás miembros de su equipo por facilitar a medida de lo posible el suministro de animales para la experimentación.

A mi madre, Lourdes T. de Lima Horta y a mi padre, José de Anchieta de Castro e Horta, por toda la dedicación, amor, incentivo y apoyo que siempre me han proporcionado.

A mi suegra Maria Neusa de Moura Kraft y a mi suegro Rubens Carlos Kraft (*in memoriam*), por todo cariño, respeto, incentivo y apoyo que he recibido.

!!!Muchas Gracias!!!

Muito obrigado!!!

ÍNDICE

Listado de abreviaturas	8
Listado de figuras y Tablas.....	9
1 - Introducción.....	12
2 - Hipótesis y Objetivos.....	16
3 - Materiales y métodos	18
<i>3.1 - Diseño experimental.....</i>	<i>18</i>
<i>3.2 - Animales</i>	<i>19</i>
<i>3.3 – Inyección de trazadores neuronales</i>	<i>20</i>
<i>3.4 – Procesamiento del material para microscopía óptica.....</i>	<i>24</i>
<i>3.5 – Procesamiento del material para microscopía electrónica.....</i>	<i>26</i>
<i>3.6 – Criterios citoarquitectónicos y nomenclatura</i>	<i>27</i>
<i>3.7 - Análisis de las preparaciones y reconstrucción tridimensional</i>	<i>27</i>
4 Resultados	31
<i>4.1 - Aferencias al subnúcleo medial del Mot7 relacionadas con el reflejo auditivo de sobresalto</i>	<i>31</i>
<i>4.2 - Conexión directa entre las CRNs y las motoneuronas auriculares</i>	<i>35</i>
<i>4.3 – Caracterización del área de influencia de las CRNs en PnC.....</i>	<i>44</i>
<i>4.4 – Conexión indirecta entre las CRNs y el Mot7 vía PnC</i>	<i>51</i>
5 - Discusión	57
<i>5.1 – Discusión metodológica.....</i>	<i>57</i>
<i>5.2 – Orígenes de las aferencias al subnúcleo medial del Mot7 relacionadas con el reflejo auditivo de sobresalto</i>	<i>64</i>
<i>5.3 - Las neuronas de la raíz coclear y el reflejo auricular asociado al reflejo auditivo de sobresalto.....</i>	<i>71</i>
6 – Conclusiones.....	80
Bibliografía.....	83
ANEXOS	93
<i>A – Figuras ilustrativas de las neuronas de la raíz coclear y de la organización musculotópica del núcleo motor del nervio facial.....</i>	<i>93</i>
<i>B - Casos experimentales.....</i>	<i>94</i>
<i>C - Técnicas para estudio citoarquitectónico.....</i>	<i>95</i>
<i>D – Morfometría de somas en PnC</i>	<i>98</i>
<i>E – Datos de los registros electrofisiológicos representados en las Figuras 11 y 12... </i>	<i>99</i>

LISTADO DE ABREVIATURAS

Números en las figuras	
10	Núcleo motor dorsal del vago
12	Núcleo del hipogloso
6	Núcleo abducens
3	Núcleo oculomotor
4	Núcleo troclear
Abreviaturas en el texto y en las figuras	
μA	microampere
μm	micrómetro
4V	cuarto ventrículo
5n	nervio trigémino
7a	núcleo accesorio del nervio facial
7n	nervio facial
8n	nervio vestíbulo-coclear
A5	grupo de neuronas noradrenérgicas 5
ABC	complejo avidina biotina peroxidasa
Amb	núcleo ambiguo
Aq	Acueducto mesencefálico (Sylvius)
BDA	dextrano amino biotinado
CGPn	sustancia gris del puente
CRNs	Neuronas de la raíz coclear
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro
DC	núcleo coclear dorsal
DLL	núcleo dorsal del lemnisco lateral
FG	Fluro-Gold [®]
g7	Rodilla del nervio facial
Gi	núcleo reticular gigantocelular
IC	colículo inferior
IMLF	núcleo intersticial del fascículo longitudinal medial
IP	núcleo interpeduncular
IRt	núcleo reticular intermedio
LL	lemnisco lateral
LPGi	núcleo paragigantocelular lateral
LSO	oliva superior lateral
Mcp	pedúnculo cerebelar medio
Me5	núcleo mesencefálico del trigémino
MG	núcleo geniculado medial
mlf	fascículo longitudinal medial
Mot5	núcleo motor del nervio trigémino
Mot7	núcleo motor del nervio facial
MTB	núcleo medial del cuerpo trapezoide
PAG	substancia gris periacuedotal
PCRt	núcleo reticular parvicelular
PL	región paralemniscal
Pn	núcleos del puente
PnC	núcleo reticular caudal del puente
PnO	núcleo reticular oral del puente
Pr5	núcleo sensitivo principal del nervio trigémino
py	tracto piramidal
RAS	reflejo auditivo de sobresalto
RN	núcleo rubro
RR	núcleo retrorubral
SC	colículo superior
scp	pedúnculo cerebelar superior
SN	sustancia nigra
SOC	complejo olivar superior
Sol	núcleo del tracto solitario
sp5	tracto espinal del nervio trigémino
Sp5	Núcleo espinal del trigémino
tz	Cuerpo trapezoide
VCA	Núcleo coclear ventral anterior
VCP	Núcleo coclear ventral posterior
VLL	Núcleo ventral del lemnisco lateral
VLTg	área tegmental ventrolateral
TF	tampón fosfato 0,1M pH 7,4

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 – Inyección FG en el subnúcleo medial del Mot7.....	32
Figura 2 – Dibujos de cámara clara de secciones coronales, ilustrando la distribución de las neuronas retrógradamente marcadas después de la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7.....	33
Figura 3 - Resultados de los experimentos de doble trazado..	36
Figura 4 - Dibujos de cámara clara de secciones coronales del Mot7 ipsolateral.....	37
Figura 5 – Distribución de las motoneuronas retrógradamente marcadas (FG, marrón) y colaterales axónicos anterógradamente marcados (BDA, negro) en el tercio rostral del subnúcleo medial del Mot7.	40
Figura 6 – Fotomicrografías de secciones coronales del subnúcleo medial del Mot7 procesadas para revelar ambos trazadores neuronales en experimentos de doble trazado	41
Figura 7 – Ultraestructura de aposiciones axosomáticas en el subnúcleo medial del Mot7.	42
Figura 8 – Ultraestructura de aposiciones axodendríticas en el subnúcleo medial del Mot7.....	43
Figura 9 – Esquemas de la distribución de los colaterales axónicos anterógradamente marcados en PnC después de la inyección de BDA en la raíz coclear..	45
Figura 10 –Registros de la actividad electrofisiológica en PnC evocada por la estimulación acústica.	46
Figura 11 – Gráficas de los datos de latencia en media obtenidos con los registros electrofisiológicos en la región de PnC que responde a estimulación acústica.....	47
Figura 12 – Gráficas de los datos de actividad (espigas /segundo en media) obtenidos con los registros electrofisiológicos en PnC..	48
Figura 13 – Inyecciones de BDA en la porción auditiva de PnC bajo control electrofisiológico.	49
Figura 14 – Esquemas de secciones coronales del Mot7, ordenadas de caudal a rostral, en los casos de inyección de BDA en la porción auditiva de PnC.....	52
Figura 15 – Reconstrucción 3D del Mot7 con colaterales axónicos y botones marcados después de la inyección de BDA en la porción auditiva de PnC..	543
Figura 17 – Esquema de las conexiones directas y indirectas entre las CRNs y las motoneuronas auriculares, relacionadas con el reflejo auricular asociado al RAS.....	77

Anexo A - Raíz coclear, las neuronas de la raíz coclear (CRNs) y la organización musculotópica del Mot7.....	93
Anexo B - Tabla 1 – Casos experimentales utilizados en este estudio.....	94
Anexo C - Técnicas de citoarquitectura..	97
Anexo D - Tabla 2 - Morfometría de somas retrógradamente marcados en PnC tras la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7.	98
Anexo D - Tabla 3 - Morfometría de somas post-sinápticos a los terminales de las CRNs en PnC.	98
Anexo E – 2 – Datos de la Figura 11A.....	99
Anexo E – 3 – Datos de la Figura 11B.....	99
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11C.....	99
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11D.....	99
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11E.....	100
Anexo E – 1 – Datos de las Figuras 12A y 12B.....	100
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12C.....	100
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12D.....	101
Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12E.....	101

INTRODUCCIÓN

1 - INTRODUCCIÓN

Las neuronas de la raíz coclear (CRNs) están dispuestas a lo largo de las fibras nerviosas de la porción central del nervio coclear, centralmente a la cúpula glial (Lorente de Nó, 1926, 1933b). Como las CRNs se sitúan periféricamente a la bifurcación de los aferentes primarios (Osen y cols., 1991), son las primeras neuronas del sistema nervioso central a recibir aferencias desde las fibras del nervio coclear (Harrison y cols., 1962; Merchán y cols., 1988). Además, las CRNs disparan potenciales de acción en respuesta a estimulación acústica con una latencia muy pequeña de aproximadamente 2,2 ms (Sinex y cols., 2001). Aún que las CRNs estén dentro del nervio coclear, sus eferencias se dirigen a núcleos de integración sensoriomotora (López y cols., 1999), incluyendo especialmente el núcleo reticular caudal del puente (PnC). Esta posición privilegiada y patrón de conectividad posibilitan que las CRNs estén involucradas en la deflagración del reflejo auditivo de sobresalto (RAS), un reflejo acústico motor (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Nodal y López, 2003).

Un componente esencial del RAS es el reflejo auricular, el cual también es evocado por un estímulo acústico intenso y presenta modulaciones similares al del RAS (Cassella y Davis, 1986; Pilz y cols., 1988; Li y Frost, 1996, 2000). El reflejo auricular posee importancia para la supervivencia del individuo, promoviendo conductas de alerta y escape por ayudar en la orientación frente al estímulo y aumentar la atención selectiva al mismo (Landis y Hunt, 1939). El reflejo auricular puede ser utilizado para estudiar la integridad de la vía auditiva al nivel del tronco del encéfalo (Francis, 1979; Taniguchi, 1985) y permite estudiar de forma aislada la activación del sistema motor del nervio facial en relación con el RAS (Pilz y cols., 1988). Sin embargo, la vía nerviosa subyacente al componente auricular del RAS no está bien estudiada.

Los músculos que dirigen los movimientos auriculares son inervados por el nervio facial, que se origina del núcleo motor del nervio facial (Mot7). El Mot7 posee una organización musculotópica bien conocida y común entre los mamíferos. Como ha sido observado en gatos (Henkel y Edwards, 1978; Populin y Yin, 1995), monos catarrinos o del viejo mundo (Welt y Abbs, 1990), monos platirrininos o del nuevo mundo (Horta-Junior y cols., 2004), ratas (Watson y cols., 1982; Hinrichsen y Watson, 1984; Friauf y Herbert, 1985) y otros mamíferos (Sherwood, 2005), los músculos auriculares son inervados por neuronas (motoneuronas auriculares) del subnúcleo medial del Mot7.

El subnúcleo medial del Mot7 recibe aferencias descendentes de estructuras mesencefálicas como la región paralemniscal (Henkel y Edwards, 1978; Takeuchi y cols., 1979; Hinrichsen y Watson, 1983; Panneton y Martin, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; May y cols., 1990) y el colículo superior (Vidal y cols., 1988; Dauvergne y cols., 2004). Sin embargo, el reflejo auricular asociado al RAS no es bloqueado “in vivo” por la sección del encéfalo en planos coronales ligeramente caudales a la región paralemniscal (Li y Frost, 1996). Por tanto, estructuras más rostrales que el núcleo reticular oral del puente (PnO) parece no ejercer un papel fundamental en el circuito neural básico subyacente al reflejo auricular en respuesta a la estimulación acústica.

El PnC es un importante núcleo de integración sensoriomotora que recibe aferencias excitatorias con latencias muy cortas (2,6 ms) después de la estimulación acústica (Lingenhöhl y Friauf, 1992, 1994). El PnC recibe información auditiva de las CRNs (Lingenhöhl y Friauf, 1994; Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Nodal y López, 2003) y envía eferencias al Mot7 (Henkel y Edwards, 1978; Takeuchi y cols., 1979; Jones y Yang, 1985; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987). Estas características sugieren que el PnC puede estar involucrado en la vía del reflejo auricular. Sin embargo, estudios previos sugerían que podría existir también una conexión directa

entre las CRNs y el subnúcleo medial del Mot7 (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). Teniendo en cuenta la latencia electromiográfica extremadamente corta del reflejo auricular en la rata, 5,5 a 7,5 ms (Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989), hemos formulado la hipótesis de que vías neurales monosinápticas o polisinápticas cortas (vía PnC) conecten las CRNs a las motoneuronas auriculares. Estas conexiones directas e indirectas cortas son consistentes con la corta latencia del reflejo auricular.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este estudio aborda cuestiones referentes a las vías neuronales que están relacionadas con el reflejo auricular asociado al RAS y son las responsables de llevar la información auditiva al Mot7. Los datos publicados hasta el momento nos inducen a pensar que además de la vía directa (postulada por López y cols, 1999), que establece la conexión entre las CRNs y las motoneuronas auriculares, pudiera haber otra vía indirecta (pasando por PnC) que enviara también información al Mot7, ya que PnC es quien recibe la principal inervación de las CRNs. Por otro lado, no hay referencias acerca de la implicación de otros núcleos relacionados con el RAS y el núcleo motor del facial.

Por ello, para estudiar cómo el núcleo de la raíz coclear y otros núcleos relacionados con el RAS alcanzan el subnúcleo medial del Mot7, donde están las motoneuronas auriculares, hemos diseñado experimentos de trazado de vías neurales, algunos bajo control electrofisiológico, que serán analizados con el microscopio óptico y electrónico.

Los objetivos concretos que nos proponemos abordar con este trabajo son:

1. Estudiar las fuentes de aferencias al subnúcleo medial del Mot7, relacionadas con el componente auricular del reflejo auditivo de sobressalto.
2. Confirmar la conexión directa entre las CRNs y las motoneuronas auriculares del Mot7 en la rata.
3. Caracterizar el área de influencia de las CRNs en PnC.
4. Estudiar la conexión indirecta entre las CRNs y el Mot7 vía PnC.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - Diseño experimental

Para estudiar la fuente de las aferencias al subnúcleo medial del Mot7, se realizará la inyección de un trazador retrógrado (FG) en el mismo. Centraremos nuestra atención en aquéllos núcleos marcados retrógradamente y que estén relacionados directa o indirectamente con el circuito del RAS.

Para confirmar la conexión entre las CRNs y las motoneuronas auriculares, realizaremos experimentos con dos trazadores neuronales inyectados simultáneamente: un anterógrado inyectado en la raíz coclear (para marcar las eferencias de las CRNs) y un retrógrado inyectado en la musculatura auricular (para marcar las motoneuronas auriculares). Parte de estos experimentos se procesarán para su estudio al microscopio óptico, analizando las yuxtaposiciones entre terminales axónicos y somas marcados. Habiendo seleccionado el área de mayor densidad de marcaje, la confirmación de la existencia de contactos sinápticos se estudiará al microscopio electrónico de transmisión.

Por otro lado, para caracterizar el área de influencia de las CRNs en PnC, realizaremos un estudio de los campos terminales de las colaterales axónicas de las CRNs en PnC tras inyectar un trazador anterógrado en la raíz coclear, al objeto de establecer las coordenadas estereotáxicas del área de influencia en PnC de las CRNs. Utilizaremos las secciones de PnC de los experimentos de doble trazado descritos anteriormente. Conociendo la región del PnC que recibe las aferencias de las CRNs, realizaremos registros eletrofisiológicos extracelulares de unidades múltiples para estudiar la actividad neuronal en PnC tras la estimulación acústica. Los registros electrofisiológicos permitirán estudiar la latencia y la actividad neuronal (descargas de potenciales de acción) frente a la intensidad, situación y frecuencia del estímulo acústico.

Estudiaremos la conexión indirecta entre las CRNs y las motoneuronas faciales vía PnC, analizando las inyecciones de un trazador neuronal (BDA) en la región de PnC que responde a la estimulación auditiva, bajo control eletrofisiológico. El BDA puede ser transportado anterógradamente y retrógradamente, permitiendo estudiar las aferencias y eferencias de la zona de inyección.

Para el reconocimiento de las estructuras nerviosas y de los componentes citoarquitecturales auditivos, emplearemos el método de Nissl, que nos permite realizar un estudio microscópico comparativo entre los casos y dibujar las secciones del encéfalo rostrocaudalmente, representando los resultados de los diferentes experimentos

3.2 - Animales

Fueron utilizadas dieciocho ratas adultas hembras de la cepa *Wistar* (Charles River, Barcelona, España), entre 270-350g (100 días de edad aproximadamente). Esta especie representa los mamíferos roedores que necesitan un funcionamiento óptimo de los reflejos acústico-motores para su supervivencia en *hábitat* terrestre, principalmente nocturno, y por ello es muy utilizada para el estudio del reflejo auditivo de sobresalto (Yeomans e Frankland, 1996; Koch, 1999). El destino de los diferentes animales utilizados en el estudio y el procesamiento seguido para su estudio se refleja en el Anexo A.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la legislación vigente (RD 1201/2005), bajo las directrices del convenio europeo para la protección de vertebrados utilizados en experimentación y otros fines científicos (DOCE L 222; 24-08-1999). Los animales fueron estabulados según las recomendaciones de la federación europea de asociaciones de animales de laboratorio (FELASA), en grupos de tres antes de cualquier manipulación quirúrgica e

individualmente después de operados. Durante todo el período de estudio, todos los animales tuvieron libre acceso al agua y comida.

3.3 – Inyección de trazadores neuronales

Todos los procedimientos fueron realizados después que el animal estuviera profundamente anestesiado, confirmando la ausencia del reflejo corneo-palpebral. La anestesia se realizó por la administración intramuscular de 1 ml/Kg de una solución compuesta de 6 mg de clorhidrato de xilacina (Rompún®, Bayer, Leverkusen, Alemania) y 40 mg de clorhidrato de Ketamina (Imalgene® 1000, Rhone Mérieuse, Lyon, Francia) en un volumen final de 0,7 ml. Cuando fue necesario durante la cirugía, la anestesia fue complementada con alícuotas de 0,1 ml de la misma solución anestésica. El animal fue posicionado en el aparato estereotáxico (#1400, Kopf, Tujunga, CA, USA) de acuerdo con el procedimiento de nivelado de bregma y lambda descrito por Paxinos y Watson (2005). Tras una incisión en la línea media de la cabeza, el cráneo fue expuesto separando los tejidos blandos, realizándose una craneotomía según las coordenadas estereotáxicas del experimento.

Cinco animales (ratas 1-5) recibieron una inyección de Fluoro-Gold® (FG; Fluorochrome, Denver, CO, USA), en el subnúcleo medial del Mot7 del lado izquierdo, de acuerdo con las siguientes coordenadas estereotáxicas: 2,2 mm caudal al plano coronal interaural, 1,8 mm lateral al plano sagital que pasa por la línea media y 0,1 mm inferior al plano horizontal interaural. El FG (2% en solución salina) se inyectó por iontoforesis a través de una micropipeta de vidrio (15 μm de diámetro interno) aplicando una corriente positiva intermitente de 3 μA (7 s encendido/7 s apagado) durante 7 minutos en los casos 1-3. En los casos 4 y 5, el FG (5-15 nl, 4% en solución salina) fue inyectado por presión utilizando una micropipeta de vidrio (40 μm de diámetro

interno) rellena de aceite de almendra y pegada a una jeringa de 10 μ l (#701; Hamilton, Reno, NV, USA) accionada por un micromanipulador (#5000; Kopf).

Se utilizaron cinco animales para experimentos de doble trazado (casos 6-10). Estos animales recibieron una inyección de dextrano amino biotinado (BDA, 10,000 PM, #D-1956; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en la raíz del nervio coclear del lado izquierdo, de acuerdo con las siguientes coordenadas estereotáxicas: 0,9 mm caudal al plano coronal interaural, 4,4 mm lateral al plano sagital que pasa por la línea media y 0,1 mm inferior al plano horizontal interaural. El ángulo vertical de abordaje fue de 20° en sentido horario y el ángulo horizontal fue de 30° en sentido horario (el plano coronal fue usado como referencia para ambos ángulos), de acuerdo con la descripción previa de López y cols. (1999). El BDA (10% en solución salina) fue inyectado por iontoforesis con una micropipeta de vidrio (20 μ m diámetro interno), empleando una corriente positiva intermitente de 5 μ A (7 s encendido/7 s apagado) durante 15 minutos. Inmediatamente después de la inyección de BDA en la raíz coclear y en el mismo lado, los animales recibieron una inyección adicional de FG, a través de la piel en el músculo *levator auris longus* (Greene, 1935). El músculo *levator auris longus*, también conocido como músculo elevador auricular posterior, ha sido elegido como representante de la región auricular debido a su accesibilidad y posición relativamente aislada. El FG (2 μ l, 4% en solución salina) fue inyectado cuidadosamente por presión con una jeringa de 10 μ l (#701; Hamilton). El material de tres casos experimentales (ratas 6, 7 y 8) fueron procesadas para microscopía óptica y muestras de los dos animales remanentes (ratas 9 y 10) fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión.

Para caracterizar la región de influencia de las CRNs en PnC y estudiar las conexiones indirectas entre las CRNs y el Mot7, ocho animales (casos 11-18) recibieron inyecciones de BDA en PnC bajo control electrofisiológico. En el caso 11 solamente realizamos el registro

electrofisiológico frente a estimulación acústica y confirmamos la ubicación del electrodo con una lesión eletrolítica. Los casos 12 y 13 recibieron dos inyecciones de trazador, BDA y dextrano-tetrametilrodamina (excitación 555nm y emisión 580nm). El dextrano-tetrametilrodamina fue utilizado en los primeros experimentos para una evaluación rápida del sitio de inyección con epifluorescencia. En el caso de haber sido efectivo el experimento, los trazadores pudieron ser individualizados por el procesado inmunohistoquímico con distintos cromógenos (BDA en negro y dextrano-tetrametilrodamina en marrón).

El PnC es un núcleo reticular muy amplio y responsable de la integración de distintas modalidades sensoriales, por ello, siempre hemos confirmado que la zona de inyección del trazador respondía a estimulación acústica utilizando los registros de la actividad extracelular de unidades múltiples. El dextrano como trazador neuronal puede ser transportado en ambos sentidos anterógradamente y retrógradamente (Veenman y cols., 1992; Reiner y cols., 2000), esta propiedad nos ha permitido estudiar las aferencias y eferencias de la porción del PnC que responde a la estimulación auditiva.

Los animales se posicionaron en un aparato estereotáxico en el cual las barras auriculares tradicionales fueron reemplazadas por conos de metacrilato torneados para el acoplamiento del sistema de estimulación acústica al meato acústico externo de la rata. La temperatura corporal se monitoreó constantemente con una sonda rectal, mantenida a 38°C por una alfombra termostática. De la misma forma que en las demás inyecciones de trazador, el cráneo se expuso y se realizó una craneotomía amplia de forma rectangular (4 x 3 mm), caudalmente a la sutura lambdaidea. Para buscar la zona auditiva de PnC, mientras realizábamos la penetración en el encéfalo con la micropipeta, se empleó ruido blanco como estímulo. La profundidad del electrodo, el ángulo y la distancia de la línea media osciló ligeramente en los primeros casos hasta que se determinó el mejor eje de penetración, que consistió en un eje inclinado 12° en

sentido horario en relación al plano coronal, 1,2 mm lateral a la línea media que pasaba junto al borde posterior del seno venoso transversal como referencia antero-posterior. Los estímulos acústicos fueron producidos por un generador de sonidos controlado por computador (Hewlett Packard-8904A multifunction synthesizer). Como electrodos, se emplearon micropipetas de vidrio (10 μm de diámetro externo) rellenas de BDA (10% en solución salina). La profundidad del tracto transcurrido por el electrodo dentro del encéfalo fue controlada a distancia utilizando un manipulador con resolución de 1 μm (microdrive Burleigh 6000 ULN Controller; Burleigh Instruments, Fishers, NY, USA). Los potenciales de acción registrados extracelularmente fueron amplificados $\times 10,000$ (BAK MDA-4I; BAK Electronics Inc., Germantown, MD, USA), filtrados (0,3–3 kHz), discriminados (BAK DIS-I Window Discriminator; BAK Electronics Inc.) y adquiridos con una resolución temporal de 10 μs utilizando una interfase de laboratorio CED-1401 Plus (Cambridge Electronic Design, UK). Variando la profundidad del electrodo, se buscó la región con actividad neuronal de mayor amplitud que respondía nítidamente a estímulos acústicos. Determinada la región de mejor respuesta electrofisiológica, se anotó la profundidad del electrodo y se realizaron histogramas periéstimos de la actividad neuronal con cien presentaciones de un estímulo de 75 ms de duración cada 500 ms, con distintas frecuencias, intensidades y localización en relación al electrodo de registro (ipsilateral, contralateral o bilateral). Terminados los registros de la actividad electrofisiológica, se inyectó BDA por iontoforesis aplicando una corriente positiva intermitente de 3 μA (7 s encendido/7 s apagado) durante 7 minutos.

En todos los experimentos, tras la inyección de trazador, los tejidos blandos fueron reposicionados suturados y se siguió la evolución del animal durante el período de supervivencia, entre 10 y 14 días.

3.4 – Procesamiento del material para microscopía óptica

Terminado el período de supervivencia, los animales fueron perfundidos a través del corazón, vía aorta ascendente, con 100 ml de una variante de la solución de Ringer libre de calcio (NaCl, 145,45 mM; KCl, 3,35 mM; NaHCO₃, 2,38 mM) pH 6,9 a 37°C, seguida de 1000 ml de una solución fijadora compuesta de formaldehído al 4% (recién preparado a partir de paraformaldehído) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (TF) a temperatura ambiente. Tras la cuidadosa extracción del encéfalo para preservar la raíz coclear intacta, se introdujo una aguja de paso (marca de lateralidad) en el encéfalo, que fue criptotejado por 48 h a 4°C en sacarosa 30% disuelta en TF. Mediante un microtomo de deslizamiento (HM430; Microm, Heidelberg, Germany) equipado con una plataforma de congelación (K400, Microm), se obtuvieron secciones coronales seriadas (40 µm de grosor) que fueron recogidas en una serie de 10 pocillos con TF.

En los casos con inyecciones de FG y dextrano-tetrametilrodamina, antes de iniciar el procesado observábamos la señal fluorescente en algunos cortes para evaluar la calidad técnica del experimento. En los casos con experimentos de doble trazado, el FG fue visualizado inmunohistoquímicamente después del revelado histoquímico del BDA. En todos los experimentos para microscopía óptica, se utilizó un criterio de color constante para la identificación del marcaje: negro para el BDA y marrón para el FG.

El BDA se visualizó al incubar las secciones (flotantes en el medio) en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Standard-kit #PK 4000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), de acuerdo con el procedimiento descrito por Hsu y cols, (1981). Los cromógenos utilizados para la reacción con la peroxidasa fueron 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB, # D-9015, Sigma-Aldrich) y sulfato de níquel y amonio (#A1827, Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo de intensificación con metales pesados (Hancock, 1982, 1984). Para ello, las secciones fueron lavadas en tampón Tris 0,05 M en solución salina con Triton X-100 al 0,5%

pH 8,0 e incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente en ABC. Tras lavar nuevamente con el mismo tampón y luego con tampón Tris 0,05 M pH 8,0, las secciones fueron incubadas en la solución de reacción histoquímica compuesta por H₂O₂ (0,003%), DAB (0,07%) y sulfato de níquel y amonio (0,04%) en Tris 0,05 M, pH 8,0. La incubación en la solución de reacción fue realizada bajo control visual con el microscopio óptico, invirtiendo una media de 15 minutos. En el caso del dextrano-tetrametilrodamina la visualización fue inmunohistoquímica empleando el anticuerpo primario anti-tetrametilrodamina hecho en conejo (1/12.000, #A-6397, Molecular Probes), el anticuerpo secundario biotinado anti-conejo hecho en cabra (1/200, #BA-1000, Vector Labs.), el complejo ABC y solamente DAB en tampón Tris (0,05M, pH 7,6) como cromógeno, produciendo un producto de reacción marrón.

El FG fue visualizado inmunohistoquímicamente tras el lavado de las secciones con Tris 0,05 M en solución salina, con Triton X-100 0,5%, pH 7,6 e incubación en anticuerpo anti-FG hecho en conejo (1/5000, #AB-153; Chemicon, Temecula, CA, USA) durante 72 h a 4 °C. Tras el lavado, las secciones fueron incubadas con anticuerpo secundario biotinado anti-conejo hecho en cabra (1/200, #BA-1000; Vector Laboratories) durante 90 min. Finalmente, las secciones fueron incubadas con ABC y con la solución de reacción histoquímica de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, utilizando solamente DAB como cromógeno (producto de reacción marrón).

Todas las secciones de cada encéfalo fueron montadas en portas y los cortes de cuatro pocillos alternados fueron contrateñidos con una variación de la técnica de Nissl o procesados con el protocolo inmunohistoquímico para visualizar los neurofilamentos SMI-32 (anexo B). Todos los cortes fueron deshidratados y cubiertos con Entellan[®] Neu (Merck). Para el estudio de la citoarquitectura y preparación de planchas para la presentación de los resultados, el encéfalo de

un animal fue procesado con el protocolo histoquímico para detectar la acetilcolinesterasa (Anexo B).

3.5 – Procesamiento del material para microscopía electrónica

Los animales fueron perfundidos a través del corazón con 100 ml de solución de Ringer libre de calcio y 1000 ml de solución fijadora (formaldehído al 4% recién preparado a partir de paraformaldehído, 0,05% de glutaraldehído y 0,0025% de CaCl₂) en tampón cacodilato 0,1 M (#20838; Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) pH 7,4 a 4 °C. Los encéfalos fueron removidos, post-fijados 2 h en el mismo fijador y cortados en secciones coronales seriadas (60 µm de grosor) utilizando un vibratomo (#VT1000S, Leica). Las secciones fueron recogidas en pocillos con TF refrigerado a 0 °C y procesadas de la forma descrita para el procesamiento del material para microscopía óptica, con tres excepciones: el Triton X-100 fue retirado de todos los tampones, el ABC Standard fue sustituido por el ABC Elite (#PK-6100; Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories) y todo el procesamiento fue realizado con soluciones refrigeradas a 0 °C hasta la inclusión en resina. Tras el procesamiento inmunohistoquímico, los cortes fueron transferidos al tampón cacodilato de sodio trihidratado 0,1 M pH 5,5 e incubados en una solución de tetraóxido de osmio al 1% (#RT 19100; Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, USA) durante 3 h. Tras la incubación con osmio, los cortes fueron deshidratados con una serie de pases en etanol de concentración creciente (35% a 70%) e incubados toda la noche en una solución de acetato de uranilo al 1% en etanol al 70%. La deshidratación fue complementada con cuatro baños de etanol al 100% y un baño en óxido de propileno. Los cortes fueron incluidos en resina epoxi (EMbed 812 resin-kit #RT 14120; Electron Microscopy Science) polimerizada a 70 °C entre láminas de acetato (Aclar #50425; Electron Microscopy Science). Tras la separación y ordenación rostro-caudal, las secciones fueron observadas al microscopio óptico para seleccionar

los niveles de corte del Mot7 que presentaron el marcaje anterógrado y retrógrado más evidente. Muestras del subnúcleo medial del Mot7 (1 x 0,5 mm) fueron recortadas y montadas en bloques de resina previamente polimerizados para la obtención de secciones seriadas semifinas (0,5 μm) y ultrafinas (color de interferencia plata-oro ≈ 70 nm) con un ultramicrotomo (Ultracut UCT, Leica).

3.6 – Criterios citoarquitectónicos y nomenclatura

Para facilitar la interpretación de este estudio y su comparación con la literatura científica, la nomenclatura y las abreviaturas utilizadas para referirse a la mayor parte de las estructuras del encéfalo siguen la nomenclatura establecida por Paxinos y Watson (2005). Las subdivisiones del Mot7 de la rata están basadas en el estudio de Watson y cols. (1982), mientras que las subdivisiones de la formación reticular se basan en los trabajos de Newman (1985) y López y cols. (1999). Hemos reconocido cuatro núcleos en la formación reticular magnocelular del puente, que de caudal a rostral son: el núcleo reticular ventral del puente, el PnC; el área tegmental ventrolateral (VLTg) y el PnO.

3.7 - Análisis de las preparaciones y reconstrucción tridimensional

Las preparaciones fueron estudiadas usando un microscopio óptico Leitz DMRB (Leica) con objetivos PL Fluotar (40x ó 100x), equipado con un tubo de dibujo, una cámara digital y conectado a un ordenador con el programa informático Neurolucida (MicroBrightField, Williston, VT, EUA).

Una muestra de los campos terminales marcados en el Mot7 de ambos lados, tras la inyección de BDA en el área de influencia de las CRNs en PnC, fue reconstruida en 3 dimensiones en el caso 19 (segmentos axónicos = 3485, botones/varicosidades = 1082). Para la

reconstrucción, fueron utilizadas 8 secciones de la porción del tronco del encéfalo que contenía el Mot7, regularmente espaciadas en intervalos de 200 μm . Cada sección fue alineada individualmente con respecto a su vecina inmediata. Los colaterales fueron representados como segmentos de líneas y los botones como esferas dentro del grosor de cada corte. También fueron reconstruidos, como referencia espacial, el contorno externo del tronco del encéfalo, los límites del Mot7 y la marca de lateralidad (paso de la aguja). Los dibujos de cada sección fueron exportados como figuras aisladas para estudio también en dos dimensiones. El modelo tridimensional fue generado, estudiado y sus imágenes capturadas usando el programa Neuroexplorer (Micro-BrightField).

Las imágenes de microscopía óptica fueron digitalizadas y almacenadas en formato TIFF (Tagged Image File Format) con una cámara digital (Axiocam MRc5, Zeiss) acoplada a un microscopio óptico Axioskop 40 (Zeiss). Los artefactos en el IV ventrículo fueron retocados y el fondo libre de tejido fue aclarado utilizando el programa PhotoShop[®] CS2 (versión 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA)

Las secciones ultra finas fueron estudiadas usando un microscopio electrónico de transmisión (EM 900; Zeiss, Oberkochen, Germany). Los campos de interés fueron fotografiados con negativos del tipo placa (Kodak #SO-163), y a partir de éstos, las electron-micrografías fueron ampliadas.

Para la preparación de las figuras, los negativos y fotos de microscopía electrónica junto con los dibujos de cámara clara fueron digitalizados con un scanner (Duoscan HID; Agfa-Gevaert, Barcelona, España). Las imágenes digitales fueron recortadas, escaladas y ajustadas para obtención de brillo y contraste óptimos con el programa PhotoShop[®] CS2 (versión 9.0; Adobe Systems Incorporated), de acuerdo con los parámetros establecidos para la preparación de imágenes digitales para publicaciones científicas (Saper, 1999; Schenk y cols., 1999), y

organizadas en planchas con el programa CorelDRAW[®] X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada).

Los análisis morfométricos fueron realizados utilizando el programa ImageJ (versión 1.41a, Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009).

Los datos de los registros electrofisiológicos fueron analizados con el programa informático SPSS para Windows (versión 15.0). Estudiamos las medias de latencia y actividad electrofisiológica frente al tipo de estímulo, localización, intensidad y frecuencia. Las diferencias entre medias fueron analizadas con el test *t* de Student para muestras independientes o bien con el test ANOVA. *A posteriori*, se ha realizado un análisis de contraste de Tukey. En todos los tests hemos empleado el intervalo de confianza al 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 - Aferencias al subnúcleo medial del Mot7 relacionadas con el reflejo auditivo de sobresalto

La inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7 origina un depósito elíptico de trazador con el eje alargado orientado en sentido rostrocaudal. En los casos 1 al 4, los sitios de inyección de FG estaban restringidos al subnúcleo medial del Mot7, entre ellos, en los casos 2 y 3, los sitios de inyección eran más pequeños y ocupaban solamente la mitad ventral de este subnúcleo (Figs. 1A y 1D). En la inyección del caso 5, el trazador difundió a las regiones adyacentes al subnúcleo medial del Mot7 (Fig. 1A). Sin embargo, la ausencia de marcaje en el núcleo coclear ventral (Figs. 2B y 2E), nos indica que el trazador no difundió ventralmente al cuerpo trapezoide.

La inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7 origina neuronas marcadas retrógradamente distribuidas en todos los niveles del tronco del encéfalo (Fig. 2). Las fibras marcadas anterógradamente se restringían a las fibras ascendentes, rodilla del facial y fibras descendentes de la raíz del nervio facial.

La región que presentó la mayor densidad de neuronas retrógradamente marcadas fue la parte rostral de la región paralemniscal, dorsalmente al núcleo ventral del lemnisco lateral (Fig. 2I). Además, fue observado un gran número de somas retrógradamente marcadas en el núcleo del tracto solitario (Fig. 2A), formación reticular bulbar (Figs. 2A y 2C), región paralemniscal caudal (Figs. 2G y 2H), columnas laterales de la sustancia gris periaqueductal, núcleo retrorubral (Fig. 2I), complejo oculomotor, núcleo rubro y tegmento del mesencéfalo (Fig. 2J).

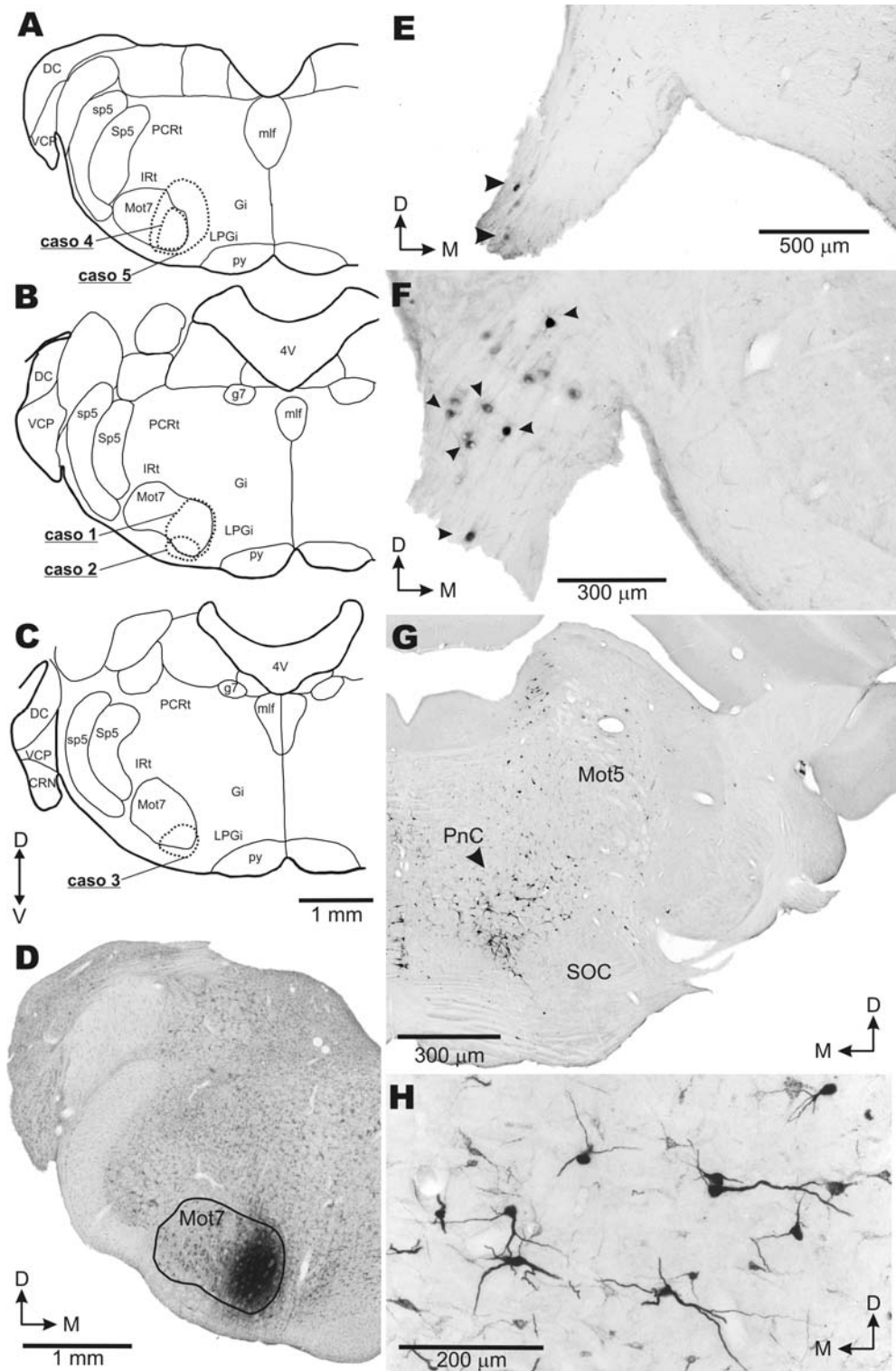


Figura 1 – Inyección FG en el subnúcleo medial del Mot7. Todas las fotomicrografías son de cortes coronales procesados para revelar FG. A - C: Dibujos de cámara clara del tronco del encéfalo indicando los sitios de inyección de FG en cada caso. D: Sección del sitio de inyección en el caso 4, teñida con tiónina. El límite externo del Mot7 está delimitado por la línea sólida. E y F: CRNs retrógradamente marcadas (punta de flecha). Inyecciones pequeñas por iontoforesis (E = caso 1) revelaron pocas CRNs marcadas, mientras que inyecciones por presión (F = caso 5) consiguieron CRNs marcadas en toda extensión de la raíz coclear ipsilateral. G: Neuronas retrógradamente marcadas en el PnC contralateral (puntas de flecha). H: Detalle de G para documentar neuronas multipolares de tamaño medio del PnC. El significado de cada abreviatura está definido en el listado de abreviaturas.

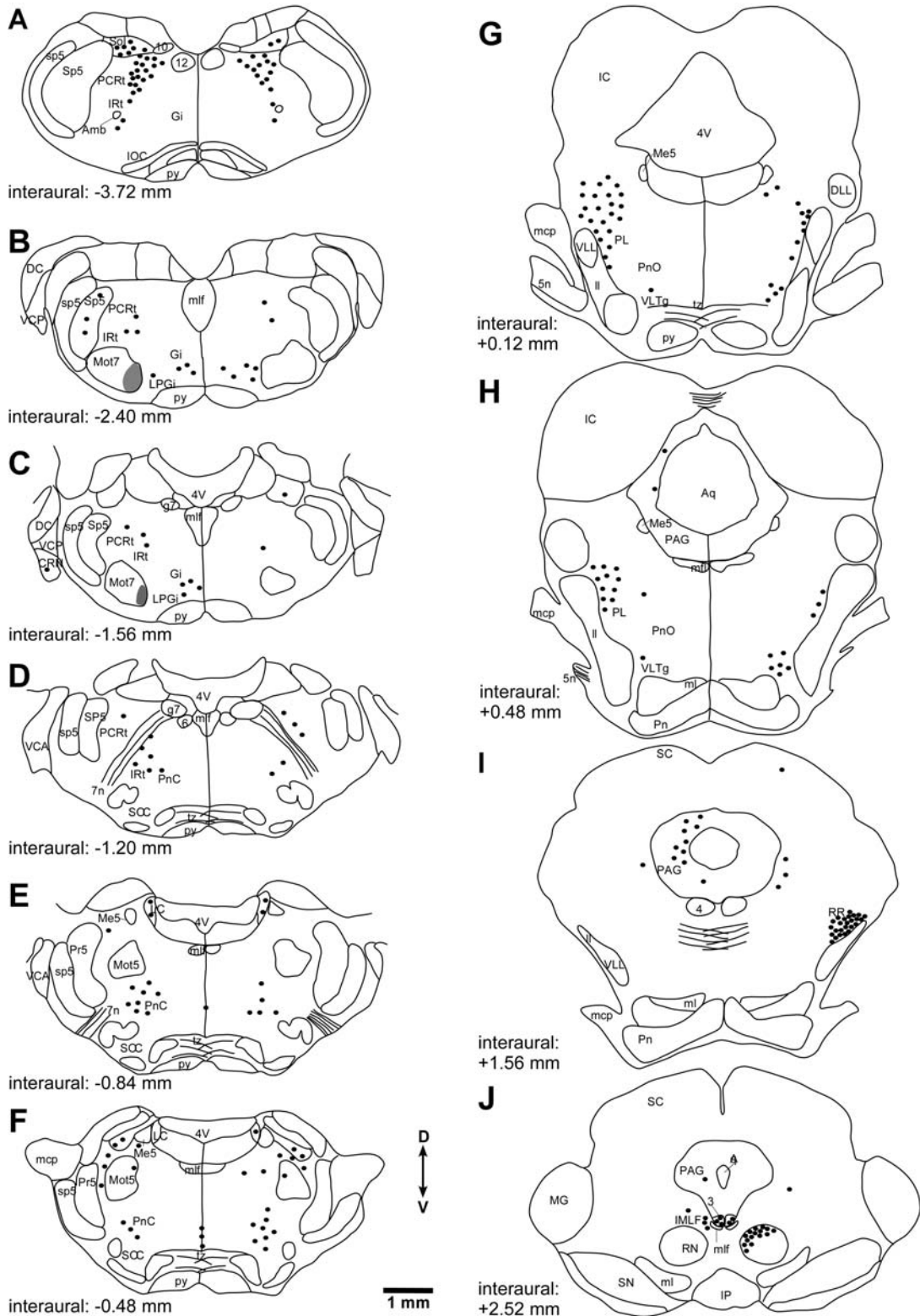


Figura 2 – Dibujos de cámara clara de secciones coronales, ilustrando la distribución de las neuronas retrógradamente marcadas después de la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7. Los esquemas fueron ordenados de caudal (A) a rostral (J). Cada punto negro representa dos perfiles neuronales (somatos) retrógradamente marcados. Las áreas en gris en el Mot7 representan el sitio de inyección. La barra de calibración y las flechas de dirección son válidas para todos los dibujos. Los niveles interaurales fueron determinados con referencia al atlas del cerebro de la rata (Paxinos e Watson, 2005). El significado de cada abreviatura está definido en el listado de abreviaturas.

En el bulbo, los somas retrógradamente marcados se distribuyeron bilateralmente, con fuerte predominancia ipsilateral, por el núcleo del trato solitario, parte dorsal del núcleo reticular parvicelular, parte dorsal del núcleo reticular intermedio y núcleo del tracto espinal del nervio trigémino. En los núcleos gigantocelular y paragigantocelular lateral, los somas marcados se distribuyeron bilateralmente, con fuerte predominancia contralateral. Ipsilateralmente, fueron observados pocos somas en el núcleo reticular rostroventrolateral (Figura 2).

En el puente, se observaron muchas neuronas retrógradamente marcadas en el PnC, entre el complejo olivar superior (SOC) y el núcleo motor del nervio trigémino (Figs. 1G y 1H). El marcaje se observó bilateralmente, con predominancia ipsilateral en niveles caudales (Fig. 2E). En niveles rostrales del PnC (Fig. 2F), se invirtió la tendencia, encontrándose en el lado contralateral la mayor parte de los somas marcados, hecho que sucede igual en el VLTg (Fig. 2G y 2H). Las neuronas marcadas en PnC tenían un soma grande, poligonal, pudiendo clasificarse como neuronas multipolares típicas en cuanto a forma (Fig. 1H). En el caso 4, se contaron los somas marcados retrógradamente ($n = 77$) y fue realizado un análisis morfométrico, encontrando dos poblaciones neuronales clasificadas como de tamaño medio ($n = 68$) o grande ($n = 9$) en base a las dimensiones de su diámetro mayor ($27,41 \mu\text{m} \pm 5,15$ y $47,5 \pm 6,32 \mu\text{m}$ de media respectivamente). Además, se encontraron somas marcados bilateralmente en posición dorsolateral al núcleo motor del nervio trigémino, en el locus coeruleus y en la parte caudal de la región paralemniscal.

En el mesencéfalo, se observaron células marcadas ipsilateralmente en la columna lateral de la sustancia gris periaqueductal y en el núcleo troclear. Las células marcadas se distribuyen contralateralmente en la parte dorsomedial, parvicelular, del núcleo rubro, en el núcleo mesencefálico profundo y en la parte rostral de la región paralemniscal también conocida como núcleo retrorubral. En esta última región, la gran densidad de células intensamente marcadas, se

destaca en la extremidad rostral de la región paralemniscal, situada dorsalmente al núcleo ventral del lemnisco lateral (Figura 2I). Neuronas marcadas bilateralmente con predominancia ipsolateral se distribuyeron en el núcleo intersticial del fascículo longitudinal medial y en el núcleo oculomotor, partes principal y parvicelular (Figura 2J).

No se observaron neuronas marcadas en los núcleos cocleares ni en ningún núcleo a lo largo de la vía auditiva (Fig. 2), con la excepción de las neuronas encontradas en la raíz del nervio coclear, las típicas CRNs, que fueron observadas ipsolateralmente al sitio de inyección de FG (Figs. 1E, 1F y 2C). No se observaron neuronas retrógradamente marcadas en niveles más rostrales al núcleo rubro hasta el final del hipotálamo.

4.2 - Conexión directa entre las CRNs y las motoneuronas auriculares

En los experimentos de doble trazado, el marcaje con BDA se distinguió claramente del marcaje con FG y de las estructuras vecinas por criterios morfológicos y de color. Tras la inyección de FG en el músculo *levator auris longus*, fueron encontradas neuronas marcadas retrógradamente exclusivamente en el subnúcleo medial del Mot7 del lado ipsolateral. Estas neuronas que inervan la musculatura auricular (neuronas auriculares) formaban una columna que se extendía por el eje rostrocaudal del subnúcleo medial del Mot7 (Figs. 3A, 3C punta de flecha y 3D). El producto de reacción inmunohistoquímico del FG rellenó el soma y sus dendritas proximales, que no presentaban espinas y estaban dispuestas en todas las direcciones, respetando solamente el límite lateral del subnúcleo medial (Fig. 3D).

En las inyecciones de BDA, el sitio de inyección se restringió a la raíz coclear y no hubo difusión del trazador en el núcleo coclear ventral o estructuras vecinas (Fig. 3E, asterisco). El trazador fue captado por fibras de paso del nervio coclear, las cuales pudieron ser observadas hasta su típica bifurcación y término en los núcleos cocleares ipsolaterales (Fig. 3E, flecha punteada).

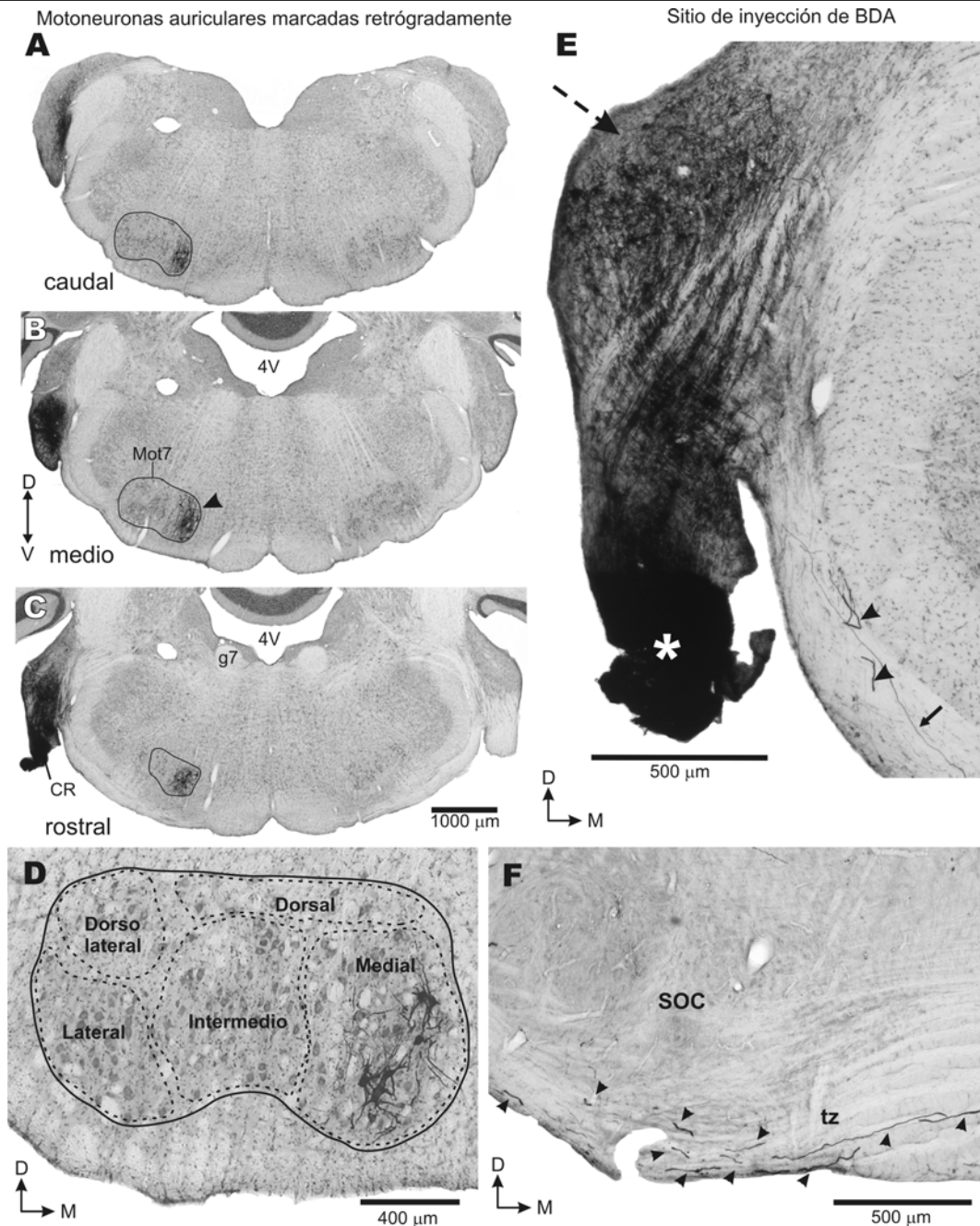


Figura 3 - Resultados de los experimentos de doble trazado. Todas las fotomicrografías fueron obtenidas de secciones coronales procesadas para revelar ambos trazadores: dextrano amino biotinado (BDA) inyectado en la raíz coclear y Fluoro-Gold® (FG) inyectado en el músculo *levator auris longus*. A- C: Caso 6: secciones de tres niveles rostrocaudales (caudal, medio y rostral) del núcleo motor del nervio facial (Mot7), espaciadas regularmente en intervalos de 400 μm y teñidas con violeta de cresilo. La inyección de FG origina una columna de motoneuronas retrógradamente marcadas en el subnúcleo medial del Mot7 en el lado ipsilateral (B, punta de flecha). Las líneas continuas indican el borde externo del Mot7. D: Caso 7: sección del nivel medio del Mot7 teñida con violeta de cresilo para demostrar la distribución de las neuronas retrógradamente marcadas en el subnúcleo medial del Mot7. La línea continua indica el borde externo del Mot7 y las líneas discontinuas indican sus subdivisiones. E: Caso 7: Típico sitio de inyección de BDA en la raíz coclear (asterisco). La flecha punteada indica fibras del nervio coclear que terminan en los núcleos cocleares ipsilateralmente. Las puntas de flecha indican axones gruesos de las neuronas de raíz coclear (CRNs) en el cuerpo trapezoide. La flecha continua indica un axón fino de las neuronas del núcleo ventral del núcleo trapezoide. F: Sección del cuerpo trapezoide con axones gruesos de las CRNs que fueron marcados anterógradamente con BDA (puntas de flecha).

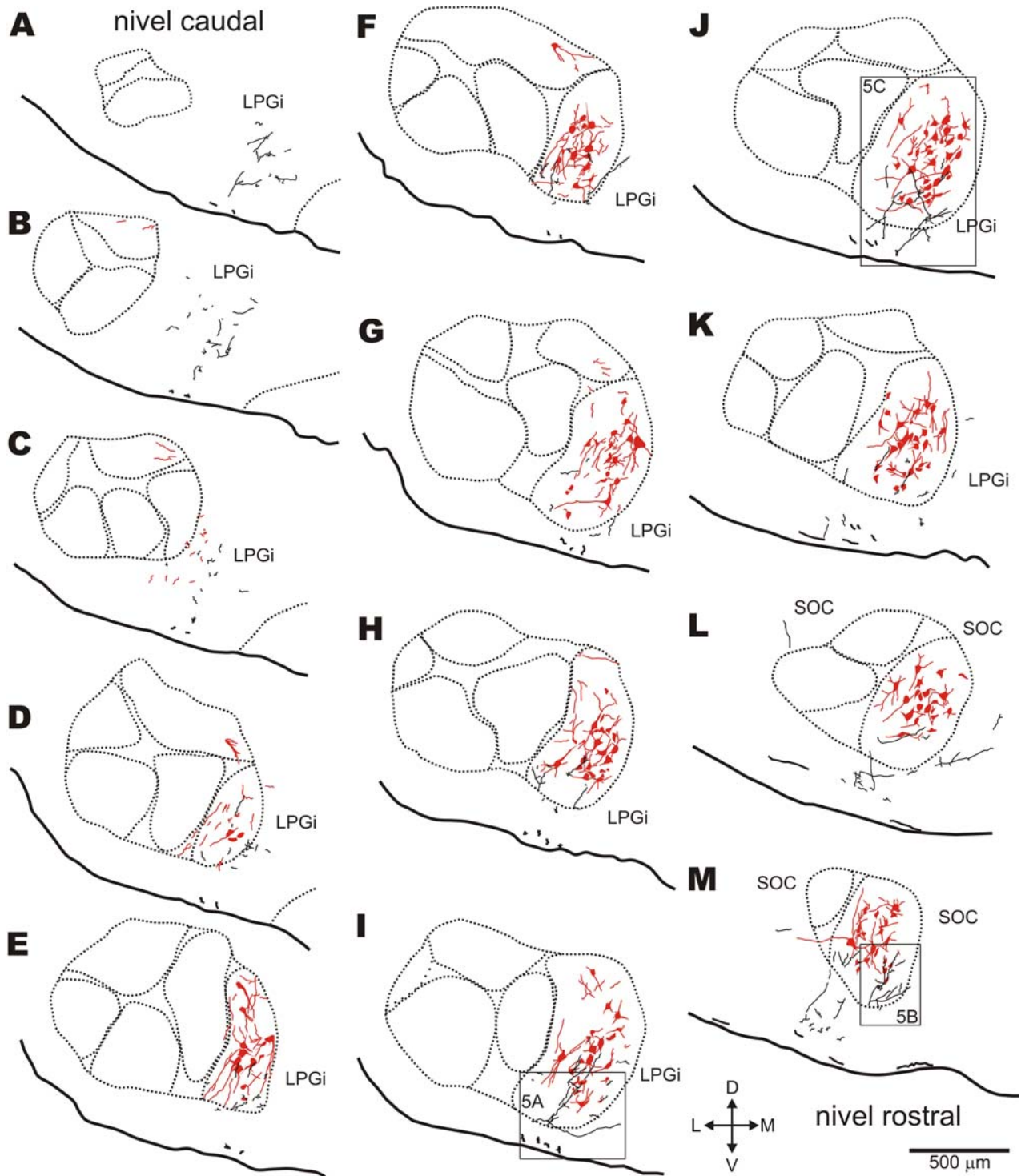


Figura 4 - Dibujos de cámara clara de secciones coronales del Mot7 ipsilateral en el caso 6. Distribución de las motoneuronas retrógradamente marcadas (FG, gris) y colaterales axones anterógradamente marcados (BDA, negro) en el subnúcleo medial del Mot7 y núcleo paragigantocelular lateral (LPGi). Los dibujos están dispuestos de caudal (A) a rostral (M) y regularmente espaciados en intervalos de 120 µm. Las líneas continuas representan el trayecto de cada colateral axónico marcado con BDA. Las líneas discontinuas representan el contorno externo del tronco del encéfalo y los límites y subdivisiones del Mot7 (Fig. 3D). Nótese el solapamiento de colaterales axónicos marcados con BDA y motoneuronas auriculares marcadas con FG en el subnúcleo medial. Las regiones señaladas con el recuadro fueran fotografiadas y componen la figura 5. La barra de calibración y las flechas de dirección son válidas para todos los dibujos. El significado de cada abreviatura está definido en el listado de abreviaturas.

Los axones marcados con BDA originarios de las CRNs se dirigen dorsalmente para penetrar en el cuerpo trapezoide (Fig. 3E, puntas de flecha). Estos axones marcados son gruesos, con diámetros de 3–7 μm . El número de axones de las CRNs marcados en cada caso varió entre 8 y 13 (Fig. 3F, puntas de flecha). Además, fueron observados bilateralmente algunos somas marcados con BDA en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide. Los axones de estas neuronas retrógradamente marcadas cursan por el cuerpo trapezoide, pero son más delgados y por tanto fácilmente distinguibles de los axones gruesos de las CRNs (Fig. 3E, flecha).

En el cuerpo trapezoide, los axones de las CRNs se dirigen hacia la línea media, ocupando frecuentemente una posición ventral en el tracto (Fig. 3F, puntas de flechas). En su trayecto, se observa cómo van generando colaterales axónicas según discurren ventralmente al complejo olivar superior y rostralmente al polo rostral del Mot7. Estas ramificaciones se dirigen caudalmente para innervar el subnúcleo medial del Mot7 (Fig. 4) y el núcleo paragigantocellular lateral (LPGi).

En el Mot7, las colaterales axónicas marcadas cursan en dirección a la superficie ventromedial y penetran en el núcleo a lo largo de su tercio rostral (Figs. 4I, 4M y 5). A este nivel el subnúcleo medial siempre es el mayor subnúcleo. Inmediatamente, tras penetrar en el subnúcleo medial del Mot7, las colaterales marcadas son cortas y gruesas, con diámetros entre 2 y 4 μm , frecuentemente se ramifican dando origen a tres o cuatro colaterales más delgadas a partir de un mismo punto, que siguen cursando rostrocaudalmente (Figs. 4M, 4J, 4I y 5). Las colaterales axónicas finas establecían campos terminales en la mitad ventral del subnúcleo medial (Figs. 4 y 5), con botones terminales y varicosidades *en passant*, predominando los primeros.

Los botones de las CRNs, marcados anterógradamente, fueron observados en yuxtaposición con los somas de las motoneuronas auriculares marcados retrógradamente (Figs. 6A y 6B) y con sus dendritas proximales (Figs. 6C y 6D). Las yuxtaposiciones axosomáticas y axodendríticas fueron observadas principalmente en los tercios rostral y medio del Mot7 (Fig. 4E

y 4M). En el tercio caudal del Mot7, no se observó ninguna yuxtaposición marcada (Fig. 4A y 4D). Además, se observaron botones marcados sobre somas no marcadas de neuronas contrateñidas o dispersos por el neuropilo.

Al nivel del polo caudal del Mot7, se observaron colaterales axónicas en el LPGi ipsolateral (Figs. 4A y 4C). En este nivel, el subnúcleo medial del Mot7 es pequeño o está ausente y no se encontraron motoneuronas auriculares retrógradamente marcadas. Por tanto, además de establecer conexión con motoneuronas del subnúcleo medial del Mot7 en sus tercios medio y rostral, las CRNs se proyectan a la formación reticular alrededor de su polo caudal.

Ultraestructuralmente, las motoneuronas del músculo *levator auris longus* retrógradamente marcadas fueron identificadas por la deposición de gran cantidad de material electrodensito del producto de reacción inmunohistoquímica del FG en el citoplasma. Las membranas citoplasmáticas de las motoneuronas estaban extensamente contactadas por terminales axónicas. En los somas, se observó gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso en el citoplasma y las motoneuronas presentaban un núcleo grande, con nucleolo prominente. Se observaron contactos sinápticos (Figs. 7 y 8) entre terminales axónicos de las CRNs (marcados anterógradamente con BDA) y motoneuronas auriculares del Mot7 (marcadas retrógradamente con FG). Los terminales axónicos marcados tienen un diámetro entre 0,61 - 2,17 μm y fueron considerados elementos presinápticos ya que contenían gran cantidad de vesículas sinápticas cerca de engrosamientos electrodensos yuxtapuestos a la membrana celular (Figs. 7 y 8, puntas de flecha).

Aunque los terminales presinápticos de las CRNs estuvieran intensamente marcados dificultando el estudio detallado de su morfología, en su interior, siempre fueron observadas vesículas pequeñas circulares, con diámetro entre 30–57 nm (Figs. 7B, 7E y 8C).

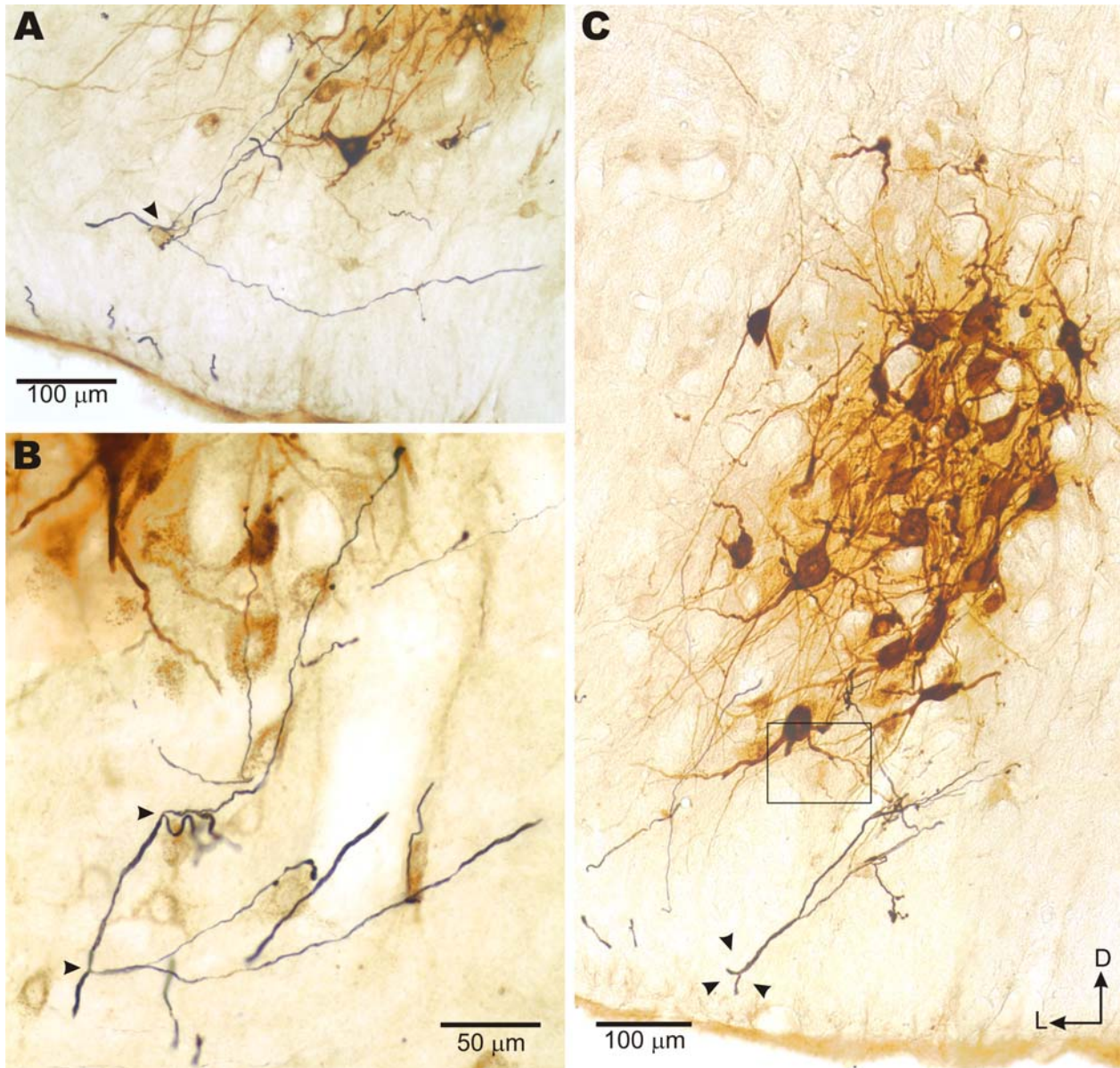


Figura 5 – Distribución de las motoneuronas retrógradamente marcadas (FG, marrón) y colaterales axónicos anterógradamente marcados (BDA, negro) en el tercio rostral del subnúcleo medial del Mot7. Secciones procesadas para revelar el FG inyectado en el músculo *levator auris longus* y el BDA inyectado en la raíz coclear. Las fotomicrografías fueran tomadas de las regiones marcadas con recuadros en la Figura 4I, 4J y 4M. **A y B:** Las puntas de flecha indican el típico patrón de ramificación de las colaterales axónicas de las CRNs en el borde ventromedial del Mot7. **C:** La punta de flecha indica una collateral axónica de las CRNs en el cuerpo trapezoide originando ramificaciones de se dirigen para el subnúcleo medial del Mot7. La región marcada con el recuadro fue fotografiada y se enseña en la Figura 6C. Las flechas de dirección son validas para todas las fotomicrografías.

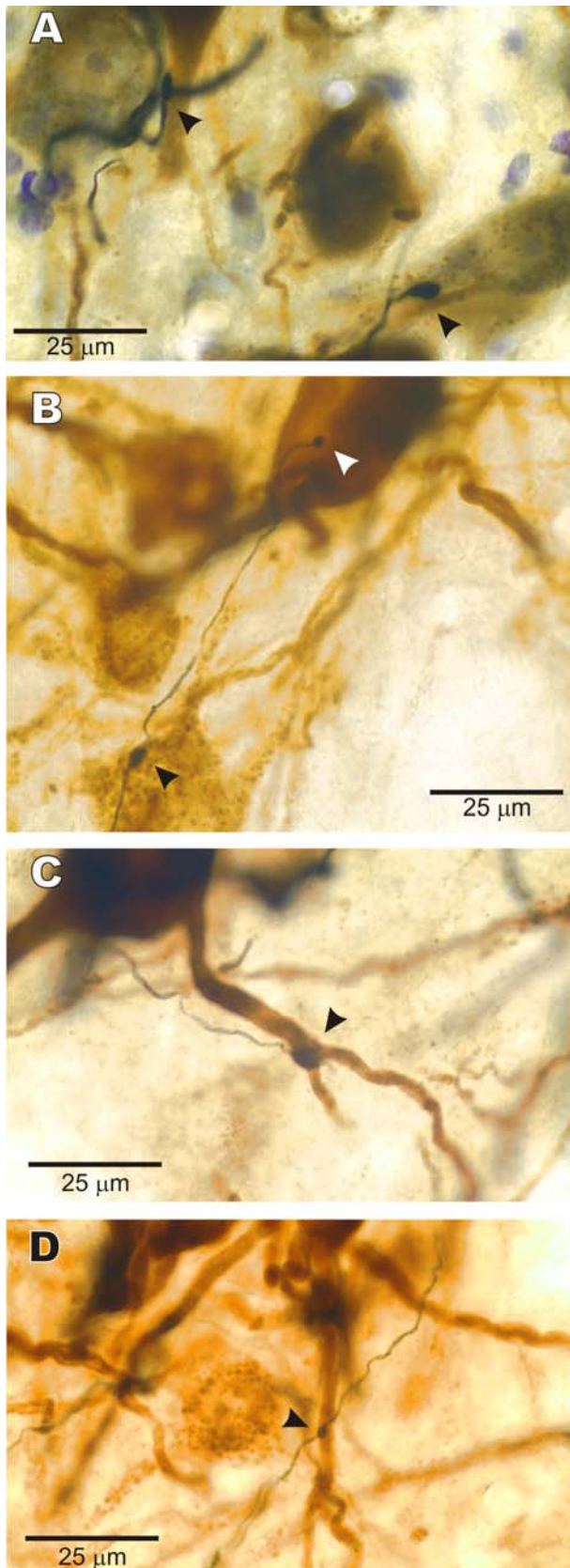


Figura 6 – Fotomicrografías de secciones coronales del subnúcleo medial del Mot7 procesadas para revelar ambos trazadores neuronales en experimentos de doble trazado: BDA (negro) inyectado en la raíz coclear y FG (marrón) inyectado en el músculo *levator auris longus*. Terminales axónicos negros pueden ser observados en aposición con motoneuronas auriculares marrones. **A y B:** Las puntas de flecha indican aposiciones axosomáticas. **C y D:** Las puntas de flecha indican aposiciones axodendríticas. La Figura 6C proviene de la región señalada en la Figura 5C.

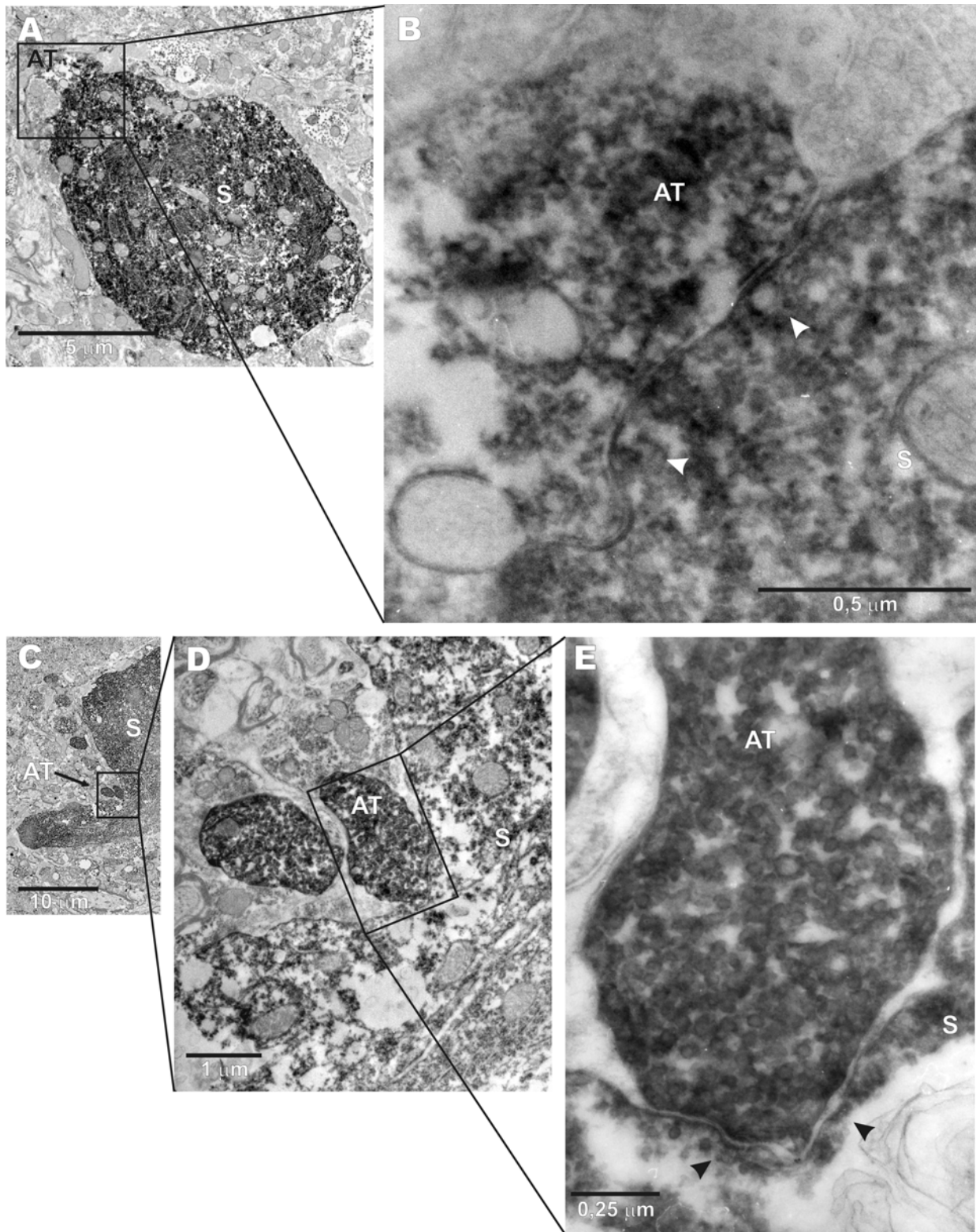


Figura 7 – Ultraestructura de aposiciones axosomáticas en el subnúcleo medial del Mot7. Electromicrografías de contactos sinápticos entre terminales axónicas de las CRNs marcadas con BDA (AT) y somas de motoneuronas marcadas con FG (S). **A, B** y **C-E** Serie de electromicrografías con aumentos progresivos. Los recuadros indican contactos sinápticos con un gran número de vesículas en el terminal axónico y engrosamientos postsinápticos (B y E, puntas de flecha).

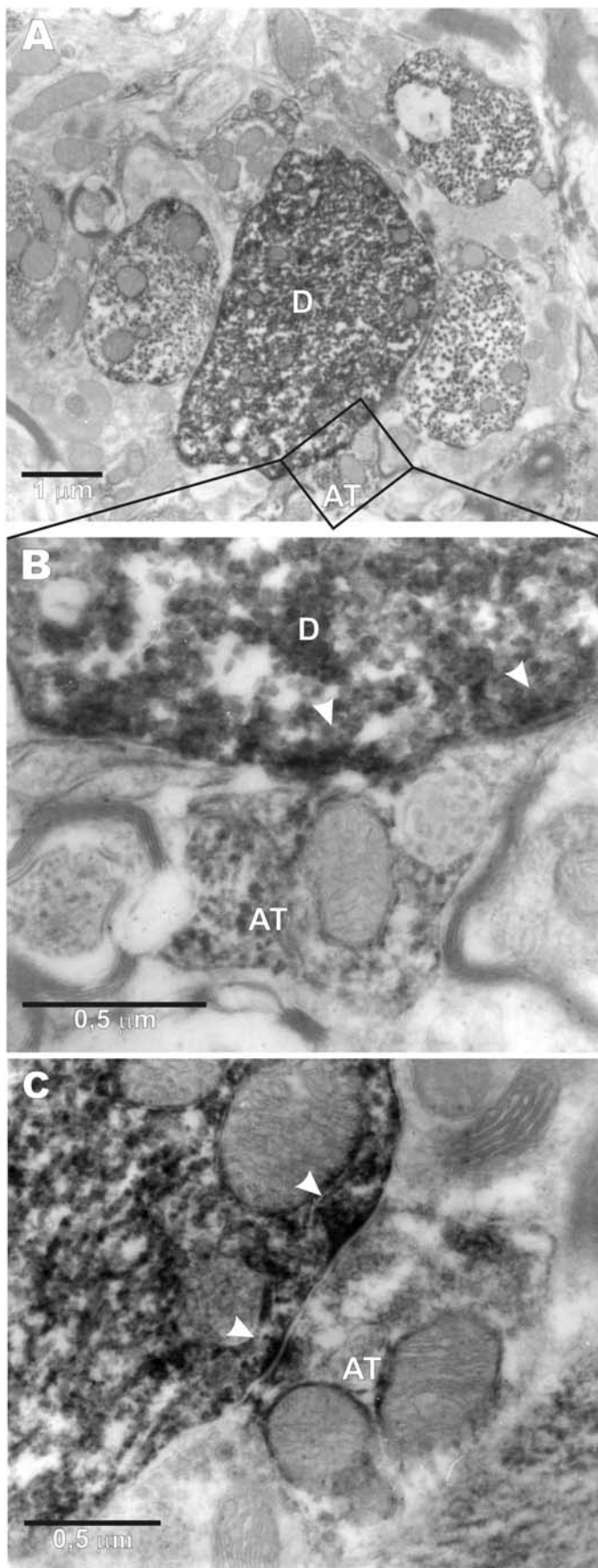


Figura 8 – Ultraestructura de aposiciones axodendríticas en el subnúcleo medial del Mot7. Electronmicrografías de contactos sinápticos entre terminales axónicos marcados con BDA (AT) y dendritas de motoneuronas faciales marcadas con FG (D). **A:** Electronmicrografía de pequeño aumento. El recuadro indica la región del contacto sináptico. **B:** Electronmicrografía de gran aumento de la región señalada en A. **C:** Electronmicrografía de un terminal axónico marcado con baja intensidad, lo que permite observar su ultraestructura con mayor detalle. Los complejos sinápticos (puntas de flechas) presentan acúmulo de material denso a los electrones en la membrana postsináptica.

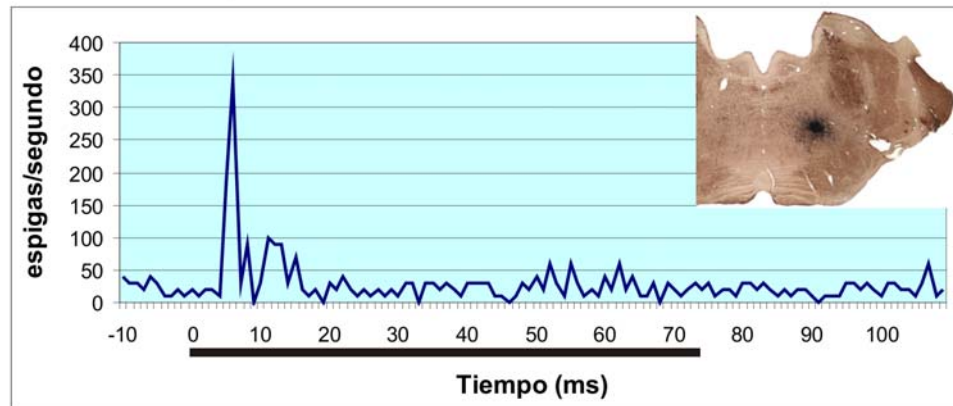
Con el microscopio electrónico, fueron observados contactos sinápticos tanto axosomáticos como axodendríticos (Figs. 7 y 8). En el caso de contactos axodendríticos, los elementos post-sinápticos eran, predominantemente, dendritas de gran diámetro (Fig. 8A). Cada terminal presentaba típicamente dos complejos sinápticos longitudinales de 60–460 nm. La hendidura sináptica midió 16–23 nm de grosor y estaba rellena con material de moderada y homogénea electrondensidad. En la mayoría de los casos, los elementos post-sinápticos presentaban engrosamientos electrondensos (Figs. 7B, 8B y 8C, puntas de flecha).

4.3 – Caracterización del área de influencia de las CRNs en PnC.

El estudio de las colaterales axónicas de las CRNs que terminaban en el PnC tras la inyección de BDA en la raíz coclear ha evidenciado que sus campos terminales ocupan la parte lateral y ventral del PnC (Fig. 9). En esta región, los terminales axónicos, predominantemente del tipo botón terminal, establecen yuxtaposiciones con neuronas reticulares grandes, con diámetro máximo de media 49,44 μm (± 13.31 , $n=8$). Los dibujos de las colaterales axónicas en PnC han demostrado que la mayor densidad de colaterales se distribuyó en los niveles rostrales del PnC (Fig. 9G y 9H) y en los caudales de su núcleo limítrofe rostralmente (PnO) así como en el área tegmental ventrolateral (Fig. 9I). Según los datos obtenidos en este estudio, hemos determinado que el área del PnC que recibe la información auditiva de las CRNs está entre las coordenadas extereotáxicas: de 0,5 mm caudal a 0,3 mm rostral al plano coronal interaural, de 1,2 a 1,8 mm lateral al plano sagital que pasa por la línea media y de 0,4 mm inferior a 0,4 mm superior al plano horizontal interaural..

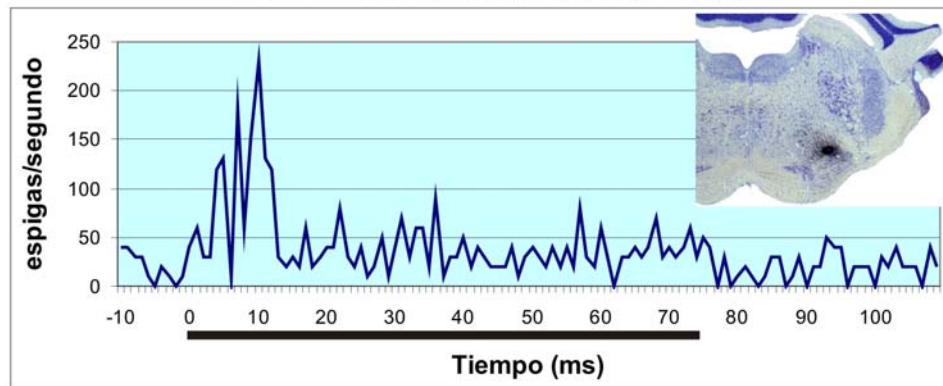
Utilizando estímulos acústicos y registrando la actividad electrofisiológica, hemos confirmado que el BDA fue inyectado en la porción auditiva de PnC.

Histogramas periestímulo Tipo de estímulo: ruido contralateral



Tipo de estímulo: tono puro contralateral

frecuencia del estímulo 32 kHz



frecuencia del estímulo 0,5 kHz

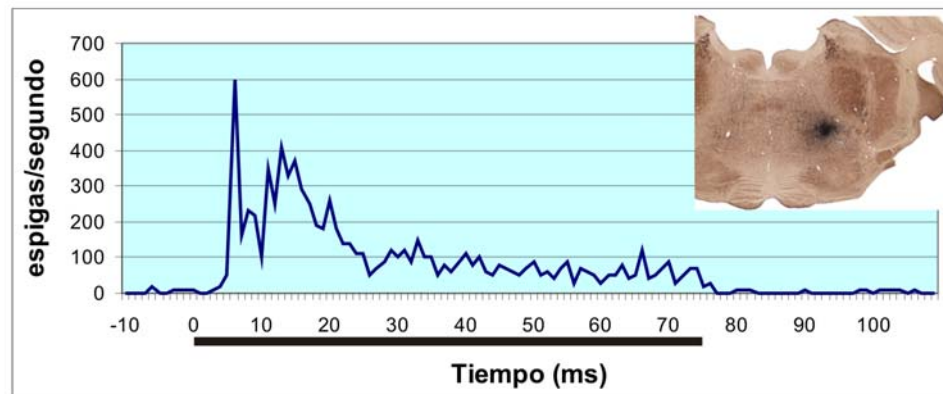


Figura 10 –Registros de la actividad electrofisiológica en PnC evocada por la estimulación acústica. Las gráficas gráficas son histogramas periestímulo realizados por la presentación de 100 estímulos repetidos (2 estímulos por segundo) con duración de 75 ms cada. A la derecha de cada gráfica se observa la fotomicrografía del sitio de registro marcado por la inyección con BDA.

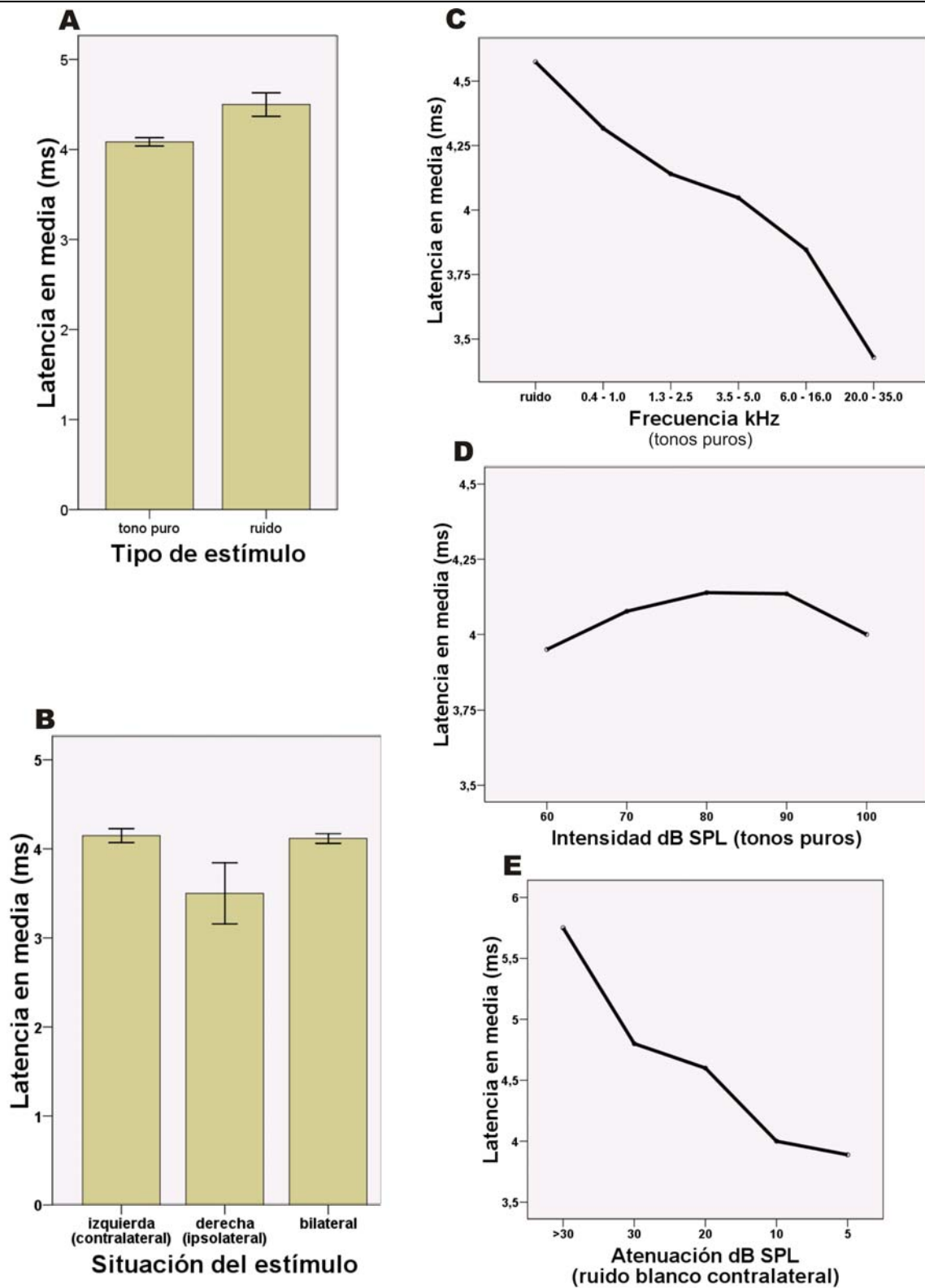


Figura 11 – Gráficas de los datos de latencia media obtenidos con los registros electrofisiológicos en la región de PnC que responde a estimulación acústica. **A:** Latencia frente al tipo de estímulo. **B:** Latencia frente a la situación del estímulo. **C:** Latencia frente a frecuencia del estímulo. **D:** latencia frente a intensidad del tono puro utilizado para estimulación. **E:** Latencia frente a la atenuación del ruido blanco utilizado para la estimulación.

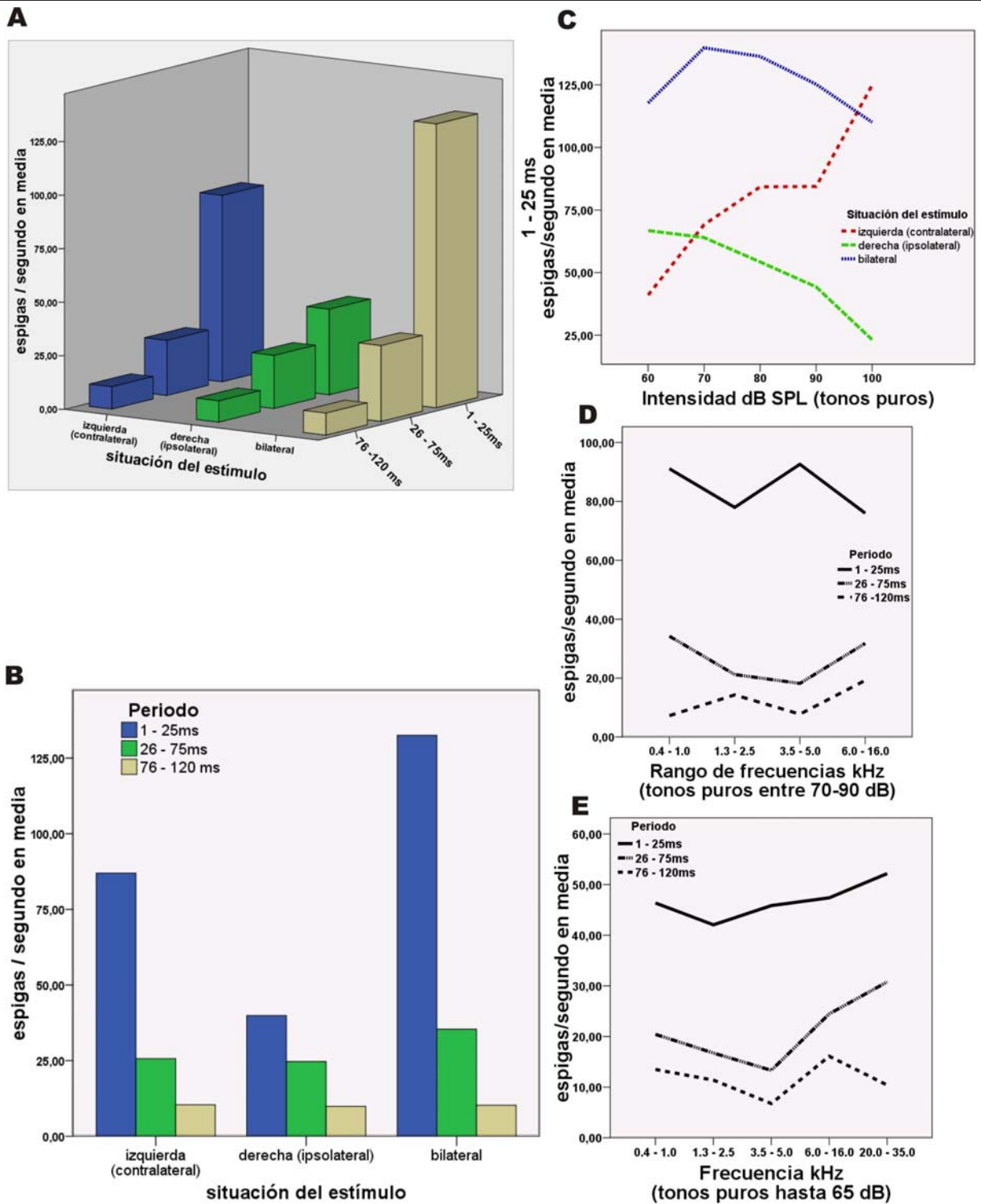


Figura 12 – Gráficas de los datos de actividad (espigas /segundo en media) obtenidos con los registros electrofisiológicos en PnC. **A:** Representación 3D de la actividad electrofisiológica frente a la situación y los distintos periodos del histograma periéstímulo. Las barras están agrupadas con el mismo color dependiendo de su situación. **B:** Actividad electrofisiológica frente a la situación y los distintos periodos del histograma periéstímulo. Las barras están agrupadas con el mismo color dependiendo del período del histograma periéstímulo. **C:** Actividad frente a la intensidad del tono puro utilizado para estimulación. **D:** Actividad frente a la frecuencia del estímulo (tono puro en el rango de intensidad fijado entre 70-90 dB) y momento del histograma periéstímulo. **E:** Actividad frente a la frecuencia del estímulo (tono puro en el rango de intensidad fijado entre 20 y 60 dB) y momento del histograma periéstímulo.

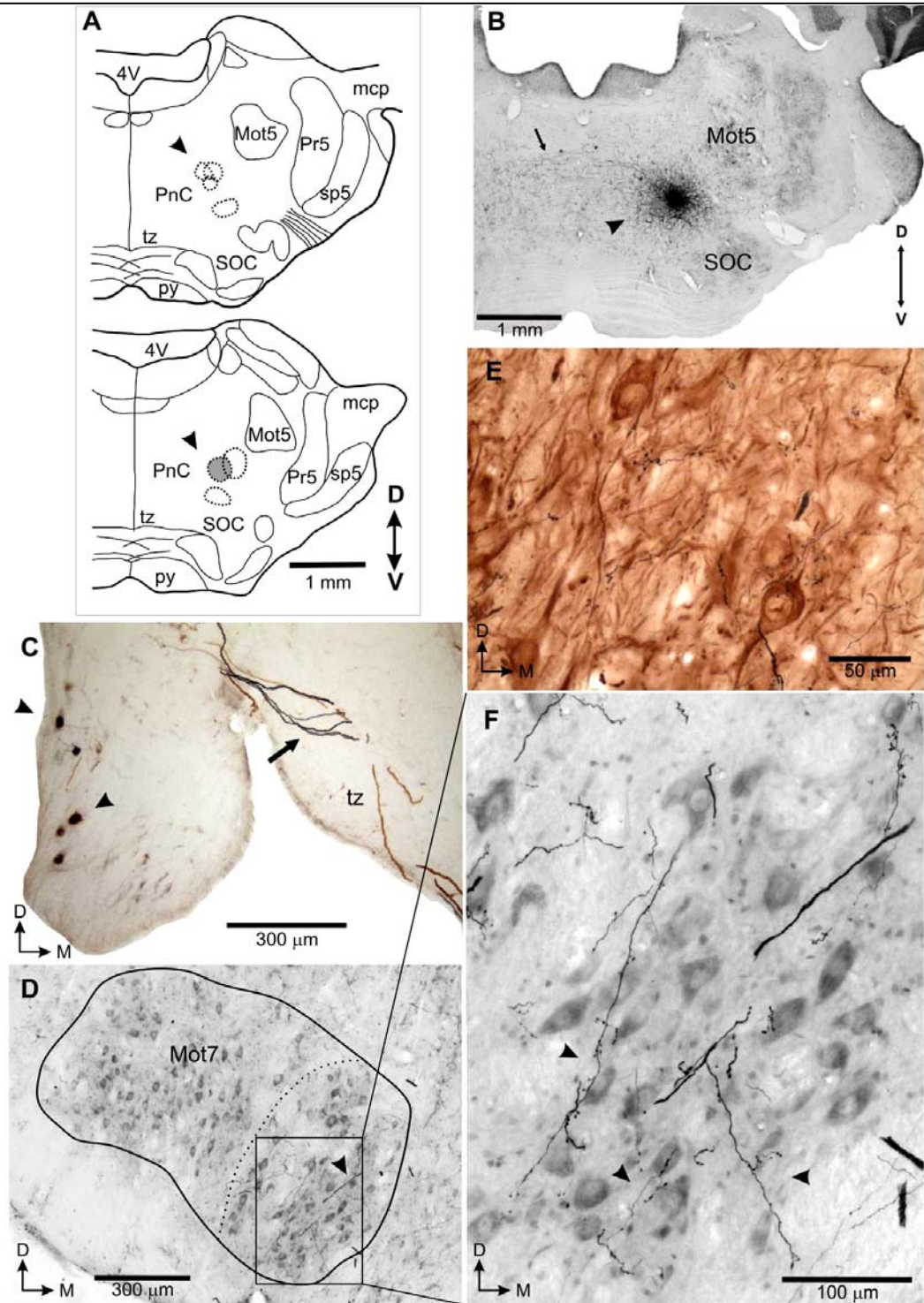


Figura 13 – Inyecciones de BDA en la porción auditiva de PnC bajo control electrofisiológico. **A:** Dibujos de cámara clara de secciones coronales de PnC, indicando los sitios de inyección (puntas de flecha). **B - E:** Fotomicrografías de secciones coronales del caso cuyo sitio está resaltado en gris, procesadas para revelar el BDA y teñidas con violeta de cresilo. **B:** Sitio de inyección (punta de flecha) y fibras marcadas con BDA que cruzan la línea media en dirección al PnC contralateral (flecha). **C:** Raíz coclear con CRNs retrógradamente marcadas (puntas de flecha) y un típico axón de las CRNs en el cuerpo trapezoide (flecha). **D:** Mot7 limitado por la línea sólida y subnúcleo medial limitado por la línea punteada. La punta de flecha indica una colateral axónica. **E:** Fotografía ampliada de la región señalada en D en la cual se observan muchas colaterales axónicas y botones marcados anterógradamente, en yuxtaposición con motoneuronas auriculares. El significado de cada abreviatura está definido en el listado de abreviaturas.

El umbral para obtener una respuesta electrofisiológica evidente en PnC con el estímulo contralateral fue de 50 dB de atenuación tras estimulación con un ruido blanco, ó 20 dB tras estimulación con tonos puros. En el caso de la estimulación bilateral, el umbral de estimulación con ruido blanco descendía a 90 dB de atenuación, mientras que permaneció inalterado con tonos puros. La mayor frecuencia de descarga (espigas /segundo) siempre estuvo en los primeros 25 ms de estimulación y en este periodo hemos podido observar de manera más evidente los cambios de la respuesta frente a distintas formas de estimulación, variando la situación, el tipo, la frecuencia y la intensidad del estímulo (Figs. 10, 12A y 12B).

Los histogramas periestímulo registrados en los sitios de inyección muestran que estas áreas responden a la estimulación acústica con latencias muy cortas ($4,17$ ms de media, $\pm 0,68$) y consistentes, con aumento de la actividad frente a la actividad espontánea durante todo el período de duración del estímulo (Fig. 10). La latencia media de respuesta al estímulo fue significativamente más rápida para la estimulación con tonos puros ($4,08 \pm 0,58$) que con ruido ($4,50 \pm 0,88$, Figura 11A). Esta diferencia sigue existiendo entre el ruido y casi todos los rangos de frecuencia estudiados, a excepción de los tonos puros de frecuencias del rango de $0,4 - 1$ KHz (Fig. 11C). Además, hemos encontrado diferencia estadísticamente significativas entre la estimulación con tonos puros de altas frecuencias del rango $20 - 35$ khz y tonos puros de bajas frecuencias $0,4 - 1$ kHz (Fig. 11C). Sin embargo, la situación del estímulo no influyó significativamente en la latencia (Fig. 11B). Empleando solamente tonos puros, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la latencia frente a diferentes intensidades del estímulo (Fig. 11D). Sin embargo, con la estimulación con ruido, hemos observado una disminución de la latencia con el aumento de la intensidad (disminución de la atenuación), que llegó a determinar diferencias estadísticamente significativas entre los rangos de atenuación 5 y >30 dB SPL (Fig. 11E).

Con respecto a la actividad electrofisiológica, utilizando tonos puros y fijando la intensidad del estímulo a un rango entre 70 y 100 dB, hemos registrado la mayor frecuencia de disparos cuando el estímulo se aplicó a ambos lados, seguido por el estímulo contralateral y por ipsilateral al sitio de registro (Fig. 12A y 12B) con diferencias estadísticamente significativas solamente en el primer periodo del histograma periestímulo (1 - 25 ms). Estudiando la actividad frente a la intensidad del estímulo (tono puro) y su situación se observó que la estimulación contralateral aumentaba la actividad neuronal directamente proporcional al aumento de la intensidad del estímulo (Fig. 12C). Sin embargo, cuando el estímulo fue ipsilateral, la relación encontrada fue inversa, disminuyendo la actividad con el incremento de la intensidad del estímulo (Fig. 12C). Con la estimulación bilateral, el nivel de actividad siempre fue muy alto y aumentó según la intensidad del estímulo hasta 70 dB, decayendo a partir de 80 dB (Fig. 12C). Aunque la actividad no estaba notablemente influenciada por la frecuencia del estímulo con tonos puros (Fig. 12D), había una tendencia a incrementar con los tonos puros de más alta frecuencia (Fig. 12E)

4.4 – Conexión indirecta entre las CRNs y el Mot7 vía PnC

Los sitios de inyección de BDA en el PnC siempre estuvieron situados en su porción lateral, dorsalmente al SOC y ventralmente al núcleo motor del trigémino (Fig.13A y13B). Los axones gruesos marcados anterógradamente se dirigieron hacia la línea media, curvándose caudalmente para entrar en el fascículo medial longitudinal. Hemos estudiado estos axones hasta el nivel cervical de la medula espinal, pudiendo afirmar por tanto que constituían la proyección retículo-espinal del PnC.

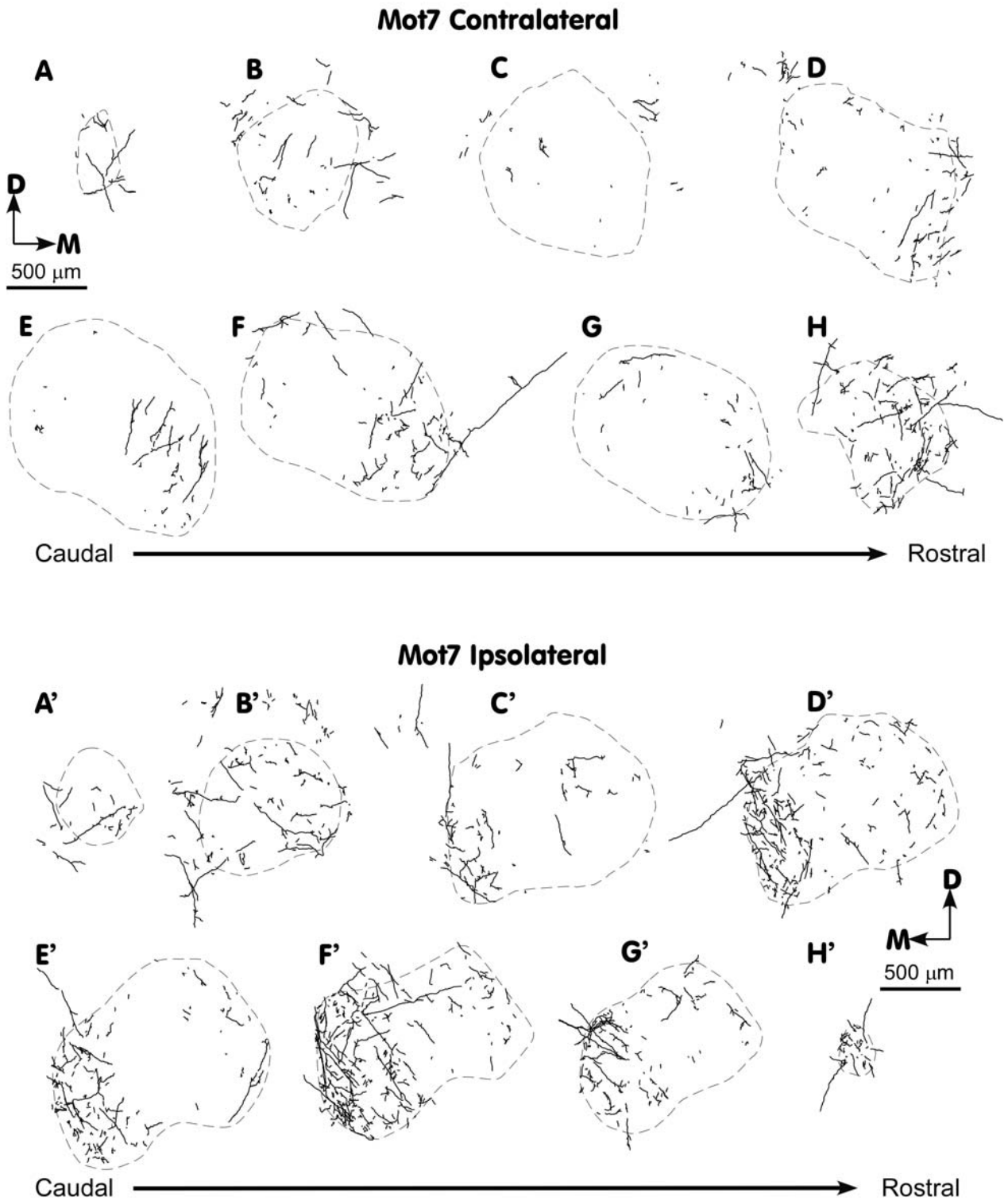


Figura 14 – Esquemas de secciones coronales del Mot7, ordenadas de caudal a rostral, en los casos de inyección de BDA en la porción auditiva de PnC. **A a H**: esquemas del Mot7 contralateral al sitio de inyección. **A' a H'**: esquemas del Mot7 ipsilateral al sitio de inyección. El límite externo del Mot7 está delimitado por la línea punteada y las colaterales axónicas por las líneas sólidas. Las barras de calibración y las flechas de dirección son válidas para todos los esquemas de cada lado.

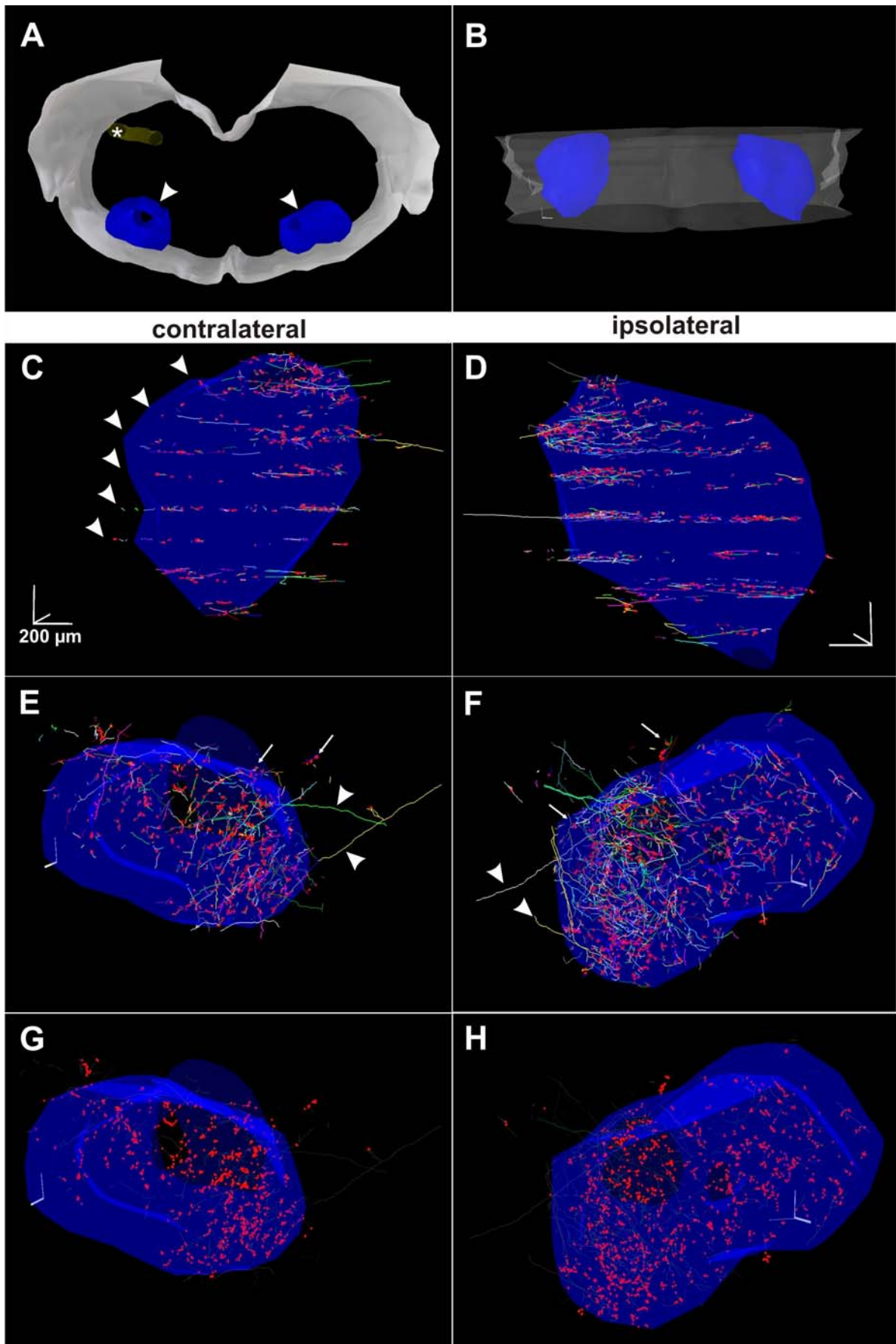


Figura 15 – Reconstrucción 3D del Mot7 con colaterales axónicas y botones marcados después de la inyección de BDA en la porción auditiva de PnC. En gris, la superficie del tronco del encéfalo. En azul, el contorno externo de, Mot7 de ambos lados. Los puntos rojos representan botones marcados con BDA. **A:** Vista frontal rostral de la parte del tronco del encéfalo reconstruida con la marca del paso de una aguja (asterisco) que ha auxiliado en el alineamiento de los cortes seriados. Se observa el Mot7 de ambos lados (puntas de flecha). **B:** Vista inferior de la porción reconstruida del tronco del encéfalo. **C e D:** Detalle de la vista inferior del Mot7 de cada lado. La distribución de los campos terminales en placas superpuestas (puntas de flecha) se deben a las secciones seleccionadas para el dibujo y reconstrucción. El intervalo entre las secciones elegidas fue de 200 μm . **E y F:** Vista frontal del Mot7 de cada lado, donde se observan las colaterales axónicas (puntas de flechas) y los botones marcados con BDA (flechas). **G e H:** Vista frontal del Mot7 donde se observan solamente los botones marcados con BDA con predominio en el subnúcleo medial de cada lado. Las barras de calibración miden 200 μm .

En el trayecto de los axones de las neuronas de PnC, muchas colaterales cruzaban la línea media para alcanzar la formación reticular del puente del lado contralateral.

Los axones gruesos de las CRNs también se marcaron bien, pudiendo ser observados de forma característica en el cuerpo trapezoide cruzando la línea media, dirigiéndose hacia la raíz coclear contralateral (Fig. 13C, flecha), donde los somas de las CRNs estaban marcados (Fig. 13C, puntas de flecha). El marcaje retrógrado de las CRNs confirma que la porción del PnC que responde a la estimulación auditiva recibe inervación de las CRNs.

También fueron observados colaterales axónicas y campos terminales en el Mot7 (Figs. 13D, 13E, 13F, 14 y 15). En ambos lados, las colaterales axónicas penetraron en el Mot7 dorsomedialmente (Fig. 13D punta de flecha, 14 y 15). Aunque la conexión entre PnC y Mot7 es bilateral se observó que la proyección ipsilateral a la zona de inyección era más prominente.

Dentro del Mot7, las colaterales axónicas dieron origen a ramificaciones más finas, que se distribuyeron en los subnúcleos lateral, dorsolateral, dorsal y medial en los que establecieron campos terminales a lo largo de toda la extensión rostrocaudal con gran cantidad de botones terminales y varicosidades *en passant* (Fig. 13E y 13F, 15G y 15H). Prácticamente no se observaron botones y varicosidades en el subnúcleo intermedio. A diferencia de los campos terminales de las CRNs, las terminaciones axonales de las neuronas de PnC constituyen varicosidades *en passant*. A partir de la reconstrucción en tres dimensiones, hemos confirmado

que el número de colaterales y botones/varicosidades fue mayor en el Mot7 del lado ipsolateral (2249 fragmentos de axones y 653 botones/varicosidades) que en el contralateral (1236 fragmentos de axones y 429 botones/varicosidades, Fig. 13E y 13F, 14 y15). Gráficamente se puede apreciar en la reconstrucción 3D la mayor densidad de colaterales y botones/varicosidades en la parte medial del Mot7 (Fig. 15). En el lado ipsolateral, hemos observado en el subnúcleo medial del Mot7 1419 fragmentos de axones y 830 botones/varicosidades (Fig. 15E y 15G). En el lado contralateral, hemos observado 767 fragmentos de axones y 233 botones/varicosidades (Figura 15F y 15H).

DISCUSIÓN

5 - DISCUSIÓN

El análisis del marcaje retrógrado tras la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7 sugirió una conexión directa de este núcleo con las CRNs y con el PnC, ambos núcleos fundamentales para el RAS (Lee y cols., 1996) y por tanto candidatos importantes para estudiar la vía del reflejo auricular asociado al RAS.

Los resultados de los experimentos de doble trazado realizados en este estudio demuestran la existencia de conexiones monosinápticas directas entre las CRNs y las motoneuronas auriculares del Mot7 del mismo lado, tanto a nivel estructural (microscopía óptica) como a nivel ultraestructural (microscopía electrónica). La conexión directa entre las CRNs y las motoneuronas auriculares es, hasta el momento, la vía más corta posible para el reflejo auricular asociado al RAS (Landis y Hunt, 1939; Horlington, 1968; Pellet y cols., 1983; Cassella y Davis, 1986; Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989). Los botones terminales procedentes de las CRNs que contactan con las motoneuronas auriculares, presentan vesículas redondas y engrosamientos post-sinápticos prominentes, pudiendo clasificarse como “asimétricos” y presumiblemente excitatorios (Uchizono, 1965; Colonnier, 1968; Somogyi y cols., 1986; Clements y cols., 1987).

La inyección de BDA en la porción del PnC que responde a la estimulación acústica provee evidencia de que esta parte del PnC recibe información auditiva de las CRNs y envía eferencias al Mot7 de ambos lados. Por tanto, las CRNs están conectadas con las motoneuronas auriculares tanto directa como indirectamente.

5.1 – Discusión metodológica

El procedimiento empleado para la inyección intramuscular a través de la piel para introducir el FG en la musculatura auricular es muy poco lesivo y se realizó en base a

descripciones previas de esta técnica (Ashwell, 1982; Hinrichsen y Watson, 1984; Welt y Abbs, 1990; Horta-Junior y cols., 2004). Mediante este tipo de inyecciones, se puede obtener una representación precisa de cada músculo de la expresión facial en el Mot7 (Watson y cols., 1982). En nuestro estudio, la distribución de las motoneuronas auriculares retrógradamente marcadas en el subnúcleo medial del Mot7, tanto en relación a la extensión rostro-caudal cuanto al posicionamiento, está de acuerdo con estudios previos (Martin y Lodge, 1977; Watson y cols., 1982; Hinrichsen y Watson, 1984; Friauf y Herbert, 1985).

El músculo *levator auris longus* ha sido seleccionado como representante de los músculos de la región auricular, ya que los músculos auriculares caudales son inervados por motoneuronas localizadas en la mitad ventral del subnúcleo medial del Mot7 (Watson y cols., 1982; Hinrichsen y Watson, 1984; Friauf y Herbert, 1985) y ésta es la región donde se distribuyen los terminales axónicos de las CRNs

El diseño del experimento de doble trazado nos permite creer que los resultados no están comprometidos por cuestiones técnicas. Aspectos fundamentales en los experimentos de múltiple trazado son: el tipo de trazador, la ubicación y separación de los sitios de inyección, el tiempo de supervivencia del animal y el protocolo de detección de los distintos trazadores en las secciones histológicas.

Los trazadores neuronales son transportados a través de mecanismos de transporte axonal descritos por primera vez en un estudio sobre el crecimiento axónico (Weiss y Hiscoe, 1948). Existen básicamente dos tipos de transporte axonal: el lento y el rápido. El transporte axonal lento (0,2 a 5 mm/día), en sentido anterógrado, está asociado a la formación de microtúbulos y neurofilamentos del citoesqueleto neuronal. El transporte axonal rápido, en sentido anterógrado (400 mm/día) y retrógrado (250 mm/día), está asociado al transporte de orgánulos membranosos y vesículas (Ochs, 1972). Los mecanismos de captación de los trazadores varían dependiendo de

sus características químicas, habiendo mecanismos de asociación con receptores de membrana (Wan y cols., 1982), difusión (Wessendorf, 1991) o durante la recaptura de las vesículas sinápticas (Mesulam, 1982).

El FG es un trazador neuronal retrógrado fluorescente. Los trazadores fluorescentes son compuestos capaces de emitir fluorescencia como resultado del cambio de su estado de excitación electrónica debido a la absorción de energía luminosa de una fuente externa (Gregory, 2002). La composición química exacta del FG no es bien conocida y su fabricante no presta información. Sin embargo, se ha demostrado que el FG es una fórmula compuesta de varias sustancias (Wessendorf, 1991), entre ellas la hidroxí-estilbamidina que sería el componente principal y el responsable de la mayoría de las características del FG como trazador retrógrado. La hidroxí-estilbamidina es una base débil que, a pH neutro, se encuentra en equilibrio con su forma protonada (cargada positivamente). La forma neutra es capaz de difundir a través de la membrana citoplásmica y penetrar tanto en el citoplasma como en orgánulos celulares. Por ello, se cree que la hidroxí-estilbamidina es captada en el sitio de inyección por difusión. En el interior de vesículas donde el pH sea ácido, el equilibrio se desplaza para la forma protonada que queda retenida. Posteriormente las vesículas son transportadas en dirección al soma donde se acumularían y rellenarían las ramificaciones dendríticas más próximas. La elección del FG como trazador retrógrado se debe a sus excelentes propiedades de transporte y relleno retrógrado del soma, además de la gran estabilidad ya observada en estudios para el trazado de varias vías neuronales (Richmond y cols., 1994; Novikova y cols., 1997; Puigdemívol-Sánchez y cols., 1998; Naumann y cols., 2000; Choi y cols., 2002).

El BDA es un trazador bidireccional, fundamentalmente anterógrado. Ha sido introducido en experimentos para mapear vías neuronales en los años 90 (Brandt y Apkarian, 1992; Veenman y cols., 1992) tras la utilización con éxito del dextrano conjugado a rodamina como trazador

neuronal anterógrado (Schmued y Heimer, 1990). Así, las propiedades del BDA son semejantes a las del dextrano conjugado con rodamina si la partícula responsable de la captación y transporte en ambos casos, el dextrano, tiene el mismo peso molecular. La propiedad de ser transportado en ambos sentidos ha sido bien explorada en los experimentos de inyección de trazador en PnC.

Utilizando el BDA, hemos podido estudiar los somas y campos terminales de neuronas: cuyas dendritas se localizaban en el sitio de inyección, cuyos axones cruzaban el sitio de inyección y cuyos colaterales axónicos terminaban o cruzaban el sitio de inyección. En este último caso, las colaterales axónicas pueden captar el trazador retrógradamente y transportarlo anterógradamente para las demás colaterales (Chen y Aston-Jones, 1998). En el caso de la raíz coclear, el sitio de inyección está aislado en una región anatómicamente restringida, en la cual solamente existen los somas y dendritas de las CRNs y las siguientes fibras de paso:

- fibras del nervio coclear, que terminan en los núcleos cocleares ipsolaterales (Lorente de Nó, 1926, 1933b, a).

- fibras olivococleares laterales y mediales, que son axones de algunas neuronas alrededor del núcleo olivar superior lateral (neuronas de la concha), en el propio núcleo y neuronas del núcleo ventral del cuerpo trapezoide (White y Warr, 1983; Vetter y Mugnaini, 1992; Warr, 1992).

- fibras vestibulares aferentes y eferentes. Las fibras aferentes primarias vestibulares se destinan a los núcleos vestibulares y al cerebelo ipsolateralmente (Strutz, 1982b, a; Carpenter y Cowie, 1985). En roedores, las neuronas eferentes vestibulares se ubican lateralmente y dorsalmente a la rodilla del nervio facial de ambos lados y en el PnC, preferentemente del lado opuesto (Strutz, 1982b, a; White y Warr, 1983).

- Fibras aferentes a las CRNs cuyo origen en parte está en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide y en el *locus coeruleos* y en otros núcleos aún por conocer (Gomez-Nieto y cols., 2008a; Gomez-Nieto y cols., 2008b).

- fibras de las CRNs, de grueso calibre, que se distribuyen fundamentalmente en núcleos de integración sensorio-motora del tronco del encéfalo (Merchán y cols., 1988; López y cols., 1999).

La inyección de BDA en la raíz coclear siempre fue realizada en un eje inclinado con orientación de dorsal-caudal-derecha para ventral-rostral-izquierda. De esta forma, la micropipeta ha pasado a través del cerebelo, caudalmente al sitio de inyección, evitando interferencias con el paso de los axones de las CRNs. Una estrategia que hemos utilizado para evaluar la efectividad del sitio de inyección en la raíz coclear fue observar el marcaje de los axones gruesos de las CRNs que cursaban por el cuerpo trapezoide y la ausencia de fibras marcadas en la estría acústica intermedia indicaba que el trazador no se había difundido y alcanzado el núcleo coclear ventral (Brawer y cols., 1974; Adams y Warr, 1976). Es lógico y esperado que el número de axones marcados guarde relación con el número de CRNs marcadas, como ya se ha descrito previamente (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). En nuestros experimentos, el número de axones de las CRNs anterógradamente marcados en el cuerpo trapezoide ha variado entre 8 y 13, representando de 20 a 30% de toda la población de CRNs estimada en 40 a 50 neuronas por raíz coclear (Merchán y cols., 1988). Por tanto, el número de axones marcados ha sido suficiente para permitir la caracterización de la proyección de las CRNs.

Debido a la captación por fibras de paso, hemos podido observar fibras nerviosas y terminales axónicos marcados en los núcleos cocleares y vestibulares, territorios no inervados por las CRNs (López y cols., 1999). La captación por fibras de paso explica también la presencia de algunos pocos somas retrógradamente marcados con BDA bilateralmente, en el núcleo ventral del

cuerpo trapezoide y contralateralmente, alrededor del núcleo olivar superior lateral. Creemos que en parte estos somas sean aferentes directos a las CRNs (Gomez-Nieto y cols., 2008b) y por otro lado, sean neuronas olivococleares marcadas retrógradamente tras la captación del trazador por axones del haz olivococlear medial y lateral. Esta hipótesis está de acuerdo con la presencia de fibras nerviosas marcadas bilateralmente en posición ventral a la rodilla del nervio facial, zonal característica de paso del haz olivococlear (Warr, 1992). Además, el número de somas marcados en el SOC y de fibras marcadas ventralmente a la rodilla del nervio facial, eran proporcionales y mayores en los casos en que el sitio de inyección estaba ubicado más medialmente en la raíz coclear.

Sin embargo, también cabe la posibilidad de encontrar somas retrógradamente marcados tras la captación del trazador por terminales axónicos yuxtapuestos a las CRNs. Se ha sugerido la existencia de cuatro tipos de terminales axónicos distintos que inervan las CRNs y probablemente posean orígenes diferentes (Merchán y cols., 1988; Gomez-Nieto y cols., 2008a). Esto puede estar relacionado con la presencia de somas retrógradamente marcados ipsilateralmente en el núcleo coclear dorsal y en la parte anterior del núcleo coclear ventral. Estas neuronas marcadas podrían estar involucradas en un mecanismo de retro-alimentación o modulación de la actividad de las CRNs, lo que estaría de acuerdo con las inferencias funcionales para las CRNs. Las CRNs actuarían como centinelas de los estímulos auditivos que penetran por el tronco del encéfalo, activando varios centros de integración sensorio-motora, entre ellos PnC lo que determinaría la deflagración del RAS (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). Sin embargo, son necesarios estudios con trazadores neuronales específicamente retrógrados para confirmar estos datos y explorar la existencia de otras fuentes de aferencias para las CRNs, como la aferencia desde el locus coeruleus descrita recientemente (Gomez-Nieto y cols., 2008a).

En los casos de inyección de BDA en el PnC, la posibilidad de captación de trazador por fibras de paso es grande. Por ello, los resultados de estos experimentos siempre han sido confirmados con otros experimentos que comprobaron la existencia de conexiones tanto en el sentido anterógrado como retrógrado. Así, las eferencias de las CRN para la mitad rostral de la porción ventrolateral de PnC, fueron demostradas tanto anterógradamente (inyección en la raíz coclear) como retrógradamente (inyección en el PnC). Del mismo modo, las eferencias de las neuronas localizadas ventrolateralmente en el PnC para el Mot7 fueron demostradas anterógradamente (inyección en el PnC) y retrógradamente (inyección en el subnúcleo medial del Mot7). La parte auditiva del PnC inerva el Mot7 y recibe aferencias de las CRN que a su vez también inervan el Mot7. Creemos que las fibras anterógradamente marcadas en el Mot7 de ambos lados tras la inyección de BDA en el PnC, no se deben al marcaje de colaterales axónicas de las CRNs por el transporte colateral-soma-colateral (Chen y Aston-Jones, 1998), ya que la proyección de las CRN es exclusivamente ipsilateral y hemos observado somas de las CRNs marcados solamente en el lado contralateral al sitio de inyección en PnC. Además, en el lado donde podría ser posible la marcación de colaterales de las CRNs en el Mot7 por transporte colateral-colateral, los colaterales axónicos penetran en el Mot7 dorsomedialmente, tal como los colaterales del PnC del lado opuesto y no como los colaterales de las CRNs que penetran en el Mot7 ventromedialmente.

La separación de los sitios de inyección, los de BDA situados intracranalmente y los de FG situados extracranalmente, hacen casi imposible que un trazador haya difundido para el sitio de inyección del otro. Además, el FG cuando se inyecta en la musculatura facial solamente es transportado retrógradamente (Choi y cols., 2002). Aunque el FG fuera transportado anterógradamente, las terminales axónicas marcadas no afectarían nuestros resultados ya que las motoneuronas del Mot7 no poseen colaterales axónicas recurrentes, como ha sido demostrado en

estudios electrofisiológicos (Kitai y cols., 1972; Fanardjian y cols., 1983) y morfológicos (Falls y King, 1976).

En los experimentos de este estudio, los tiempos de supervivencia de los animales tras la inyección del trazador han variado entre 10 y 14 días. Estos tiempos ya habían sido utilizados con éxito tanto para el BDA (Brandt y Apkarian, 1992; López y cols., 1999) como para el FG (Novikova y cols., 1997; Choi y cols., 2002).

5.2 – Orígenes de las aferencias al subnúcleo medial del Mot7 relacionadas con el reflejo auditivo de sobresalto

El objetivo del experimento de inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7 fue estudiar el origen de aferencias potencialmente relacionadas con el reflejo auricular asociado al RAS y no describir y discutir en detalle todas las vías aferentes al subnúcleo medial del Mot7.

Los resultados obtenidos tras la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7 confirmaron que los CRN son neuronas pre-motora para las motoneuronas auriculares. Sin embargo, evidenciaron también otros núcleos que se conectan al subnúcleo medial del Mot7 como el núcleo reticular parvicelular (en el nivel del Mot7 y del núcleo ambiguo), el PnC, el área tegmental ventrolateral, la región paralemniscal, la sustancia gris periaqueductal, el núcleo retrorubral y la parte dorsomedial del núcleo rubro. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que analizaron las aferencias al Mot7 en ratas (Hinrichsen y Watson, 1983; Travers y Norgren, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Grofova y Keane, 1991).

El PnC fue identificado como un centro pre-motor para las motoneuronas auriculares en este trabajo y en estudios previos (Jones y Yang, 1985; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Lingenhöhl y Friauf, 1994). Este núcleo está muy relacionado con el reflejo auditivo de sobresalto (Yeomans y Frankland, 1996; Koch, 1999). Funcionalmente, la fuente más importante

de aferencias auditivas para el PnC son las CRNs que le envían impulsos nerviosos con corta latencia y también son componente fundamental del reflejo auditivo de sobresalto (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999).

Según nuestros resultados y trabajos previos (Henkel y Edwards, 1978; Hinrichsen y Watson, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; López y cols., 1999), el área tegmental ventrolateral y la región paralemniscal caudal envían eferencias para el subnúcleo medial del Mot7 y reciben aferencias de las CRNs. El área tegmental ventrolateral esta relacionada con el reflejo de sobresalto deflagado por estímulos auditivos y táctiles (Yeomans y Frankland, 1996). Sin embargo, su importancia en el circuito fundamental del reflejo auditivo de sobresalto fue cuestionada en estudios en los que se lesionó este área (Lee y cols., 1996).

Entre los núcleos que envían eferencias al subnúcleo medial del Mot7, el que inerva con mayor número de neuronas, parece ser el núcleo retrorubral de acuerdo con los resultados de este trabajo y de trabajos previos (Takeuchi y cols., 1979; Hinrichsen y Watson, 1983; Panneton y Martin, 1983; Holstege y cols., 1984; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Grofova y Keane, 1991). Estudios morfológicos indicaron que la principal región en el tronco encefálico relacionada en el control de los movimientos auriculares en los reflejos de orientación es un área del tegmento mesencefálico. Esta área se denominó de región paralemniscal en el gato y recibe aferencias de las capas profundas del colículo superior ipsolateral, enviando gran cantidad de eferencias al subnúcleo medial del Mot7 contralateral (Henkel y Edwards, 1978; Takeuchi y cols., 1979; Henkel, 1981; Panneton y Martin, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987). Nuestros resultados basados en la delimitación citoarquitectónica propuesta por (Paxinos y Watson, 2005) y en el número de neuronas retrógradamente marcadas, sugieren que en la rata, esta región mesencefálica sea el núcleo retrorubral. La región paralemniscal del gato se extiende 500 μm en el eje rostro-caudal a partir del extremo rostral del lemnisco lateral (Henkel y

Edwards, 1978). Juzgando por la localización rostro-caudal, la región paralemniscal del gato parece corresponder al núcleo retrorubral de la rata (Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Grofova y Keane, 1991), aunque existen diferencias cuanto al trayecto de la vía (en la rata la vía es cruzada y en el gato no) que podrían ser justificadas por diferencias entre las especies. Aceptando esta premisa, la vía retrorubral-facial en la rata podría ser funcionalmente equivalente a la vía paralemniscal-facial del gato, lo que está de acuerdo con el gran número de somas retrógradamente marcadas observados en nuestros experimentos. Los datos morfológicos de conectividad están de acuerdo con los estudios funcionales que emplearon el agonista de receptores N-metil-D-aspartato en el núcleo retrorubral (Arts y cols., 1998). Además, estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos demostraron que esta región ejerce influencias excitatorias e inhibitorias sobre las motoneuronas auriculares, a través de vías monosinápticas y polisinápticas (May y cols., 1990; Chen y cols., 1995b).

Henkel y Edwards (1978), sugirieron la participación de las capas profundas del colículo superior y del área paralemniscal en el reflejo auricular. La participación del colículo superior en los reflejos relacionados con la orientación está de acuerdo con la existencia, en este nivel, de un mapa espacial que integra aferencias visuales y auditivas (Harris y cols., 1980). Una proyección directa, monosináptica tecto-facial fue descrita anteriormente en estudios morfológicos en la rata (Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987) y electrofisiológicos en el gato (Vidal y cols., 1988). Sin embargo, nuestros resultados no corroboran con la existencia de una proyección directa del colículo superior para el subnúcleo medial del Mot7 en la rata. En este trabajo y en otros estudios (Takeuchi y cols., 1979; Hinrichsen y Watson, 1983; Grofova y Keane, 1991), no se observaron neuronas retrógradamente marcadas en el colículo superior tras la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7. Así, parece que existe una vía indirecta, polisináptica, para conexión del colículo superior con el subnúcleo medial del Mot7. Esta vía estaría relacionada con el

control de los movimientos de la oreja, como fue demostrado en el gato en los trabajos de (Henkel y Edwards, 1978; Vidal y cols., 1988). Según (Henkel, 1981) y (Hinrichsen y Watson, 1983), esta vía indirecta cuenta con la intermediación del área paralemniscal rostral (núcleo retrorubral).

También se ha sugerido que una proyección oculomotor-facial podría formar parte de una vía polisináptica alternativa, a través de la cual el colículo superior ejercería influencia sobre el Mot7 (Edwards y Henkel, 1978; Takeuchi y cols., 1979). Nuestros resultados soportan la existencia de una vía directa de conexión entre el núcleo oculomotor y el subnúcleo medial del Mot7. La proyección directa del complejo nuclear del oculomotor para las motoneuronas auriculares también fue descrita en el gato (Henkel y Edwards, 1978; Takeuchi y cols., 1979; May y cols., 1990). Las proyecciones oculomotor-faciales fueron caracterizadas electrofisiológicamente (May y cols., 1990) predominantemente como excitatorias, sin embargo, también existían proyecciones inhibitorias, aunque en menor número.

Por tanto, se nota la existencia de una gran confluencia de aferencias en el subnúcleo medial del Mot7 con origen en el PnC, el VLTg, la región paralemniscal caudal, la región retrorubral y las capas profundas del colículo superior, estructuras que reciben terminales axónicos de las CRNs, según las observaciones de López (López y cols., 1999) y de este estudio (Figura 16). La confluencia de aferencias en el subnúcleo medial del Mot7 podría estar relacionada con las diversas modulaciones del reflejo auricular asociado al RAS, como la inhibición por estímulo previo, habituación, potenciación por miedo y sensibilidad a la dirección azimutal de la estimulación. (Cassella y Davis, 1986; Li y Frost, 1996; Pilz y Schnitzler, 1996; Li y Frost, 2000).

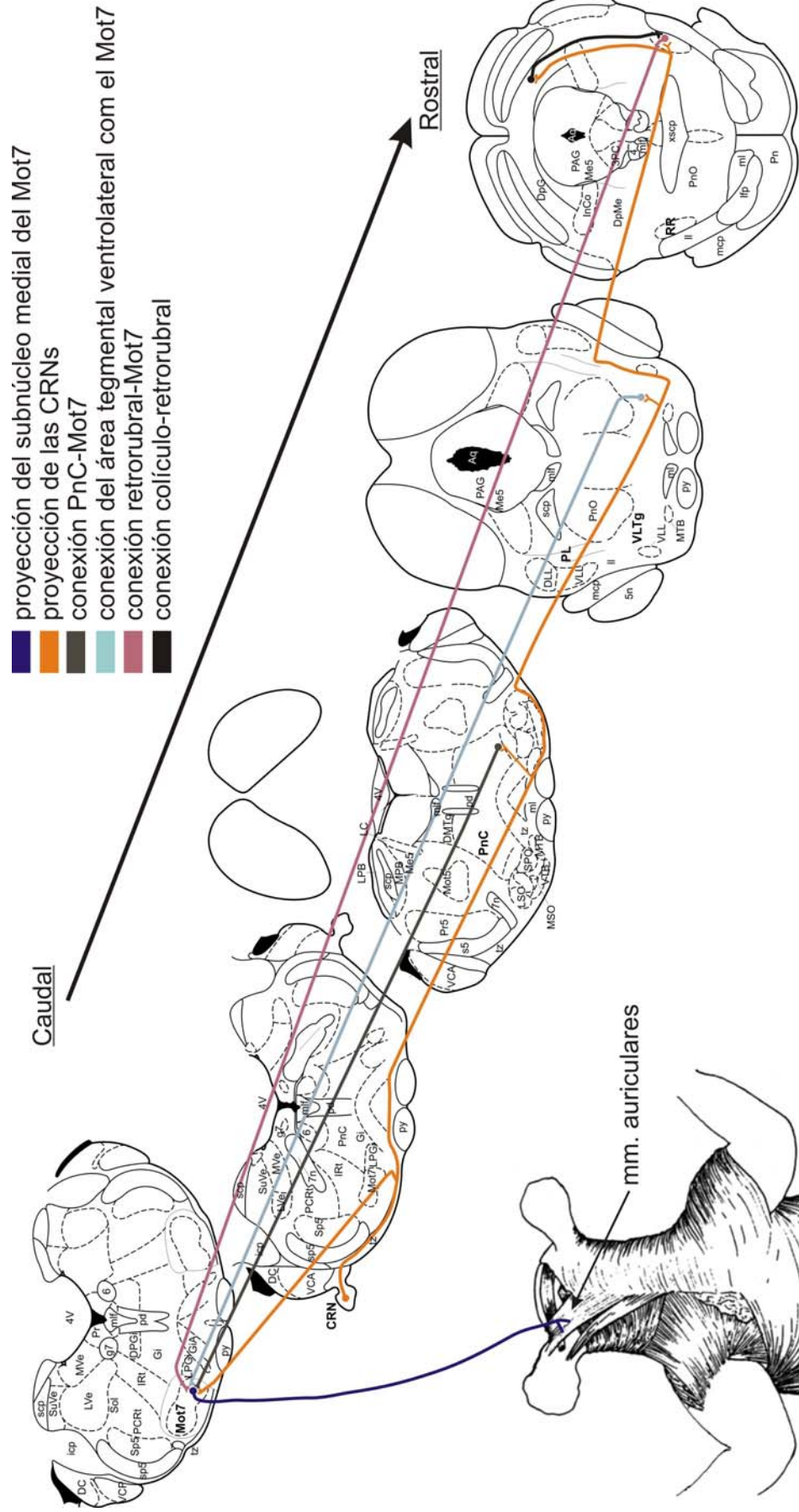


Figura 16 – Confluencia de vías neurales en el subnúcleo medial del Mot7. Los esquemas representan cortes coronales del tronco del encefálico modificados a partir del atlas estereotáxico de la rata (Paxinos y Watson, 2005) y un dibujo de la musculatura auricular (Greene, 1935). Las probables conexiones directas e indirectas de las CRNs con las motoneuronas auriculares están esquematizadas en líneas coloreadas de acuerdo con la leyenda.

Otras regiones mesencefálicas que también se conectan directamente con el subnúcleo medial del Mot7 son: el núcleo rubro, la sustancia gris periaqueductal y la formación reticular adyacente.

Estudios previos describieron que solamente el subnúcleo lateral del Mot7 estaba innervado significativamente por el núcleo rubro (Hinrichsen y Watson, 1983; Panneton y Martin, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987). Sin embargo, nuestros resultados han demostrado la conexión del subnúcleo medial del Mot7 con la parte dorsomedial, parvicelular, del núcleo rubro contralateral, de acuerdo con lo que ya había sido sugerido por Takeuchi (Takeuchi y cols., 1979) y Holstege (Holstege y cols., 1984). Nuestros resultados parecen no estar relacionados con la difusión del trazador, ya que nuestros sitios de inyección son similares, en algunos casos menores, que los sitios de inyección de HRP del estudio de Isokawa-Akesson (Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987). Estos datos morfológicos encuentran soporte funcional en el trabajo de Ghez (Ghez, 1975) que observó en gatos, diversos tipos de movimientos auriculares durante la estimulación de la parte dorsal del núcleo rubro contralateral. Pequeñas modificaciones en el posicionamiento del electrodo de estimulación desencadenaban modificaciones en la posición de la oreja. Además, el núcleo rubro es considerado una estación de relevo para impulsos nerviosos provenientes del cerebelo que se destinan a la musculatura facial (Courville, 1966; Martin y cols., 1983).

Las proyecciones provenientes de la sustancia gris periaqueductal y formación reticular adyacente están relacionadas con las expresiones faciales motivadas por factores emocionales (Hinrichsen y Watson, 1983; Panneton y Martin, 1983; Holstege, 2002). En gatos, la formación reticular mesencefálica rostral está asociada también a movimientos oculares y de la cabeza en el eje vertical (Holstege y cols., 1984; Isa y Sasaki, 2002).

En nuestros resultados, después del núcleo retrorubral, una de las principales fuentes de aferencias para el subnúcleo medial del Mot7 es la formación reticular parvicelular del bulbo, en el nivel del Mot7 y del núcleo ambiguo. La conexión directa, monosináptica entre el núcleo reticular parvicelular y las motoneuronas auriculares en la rata, fue confirmada previamente por Mogoseanu (1994), en estudios morfológicos con trazadores neuronales a nivel estructural y ultra-estructural. En esta vía toman parte proyecciones encefalinérgicas, distribuidas principalmente sobre las dendritas de las motoneuronas (Senba y Tohyama, 1983a, b). Estudios electrofisiológicos (Fanardjian y Manvelyan, 1987) y electromiográficos (Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987) demostraron que esta conexión promueve en el Mot7 respuestas excitatorias rítmicas asociadas a la musculatura de las vibrisas y de los párpados. Estudios previos indican que el núcleo reticular parvicelular constituye una estación de relevo para impulsos corticales relacionados con movimientos faciales rítmicos (Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Holstege, 2002), impulsos provenientes del sistema límbico relacionados con mecanismos autonómicos y comportamentales además de impulsos provenientes de la parte reticular de la sustancia nigra (Shammah-Lagnado y cols., 1992). Estos últimos formarían parte de la vía córtico-neoestriado-nigro-retículo-craneal, a través de la cual el cuerpo estriado y la sustancia nigra ejercen influencia en los movimientos orofaciales (von Krosigk y Smith, 1991; Mogoseanu y cols., 1994).

Sin embargo, Li y Frost (Li y Frost, 1996) comprobaron que estructuras más rostrales que el PnO no son esenciales para la deflagración del reflejo auricular. En este trabajo, los autores no verificaron diferencias significativas en los registros electromiográficos de la musculatura auricular, evocados por la estimulación auditiva, entre los animales control y los que fueron sometidos a sección transtectal que separaba el núcleo retrorubral y el colículo superior del restante del tronco encefálico. Además, el reflejo auricular asociado al reflejo auditivo de sobresalto posee una corta latencia electromiográfica entre 5,5 y 7,5 ms (Cassella y Davis, 1986;

Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989), que sugiere un circuito neural rápido y probablemente corto.

Por otro lado, los núcleos más rostrales que el PnO pueden ser importantes en las modulaciones del reflejo como la inhibición por estímulo previo y la sensibilidad a la dirección azimutal del estímulo (Cassella y Davis, 1986; Li y Frost, 1996, 2000).

5.3 - Las neuronas de la raíz coclear y el reflejo auricular asociado al reflejo auditivo de sobresalto

Los movimientos de la oreja en roedores, gatos y murciélagos mejoran la relación acústica señal / ruido por dirigir el pabellón auditivo hacia un estímulo acústico y atenuar otras fuentes de sonido (Phillips y cols., 1982; Calford y Pettigrew, 1984; Jen y Chen, 1988; Chen y cols., 1995a; Li y Frost, 1996). Por tanto, parece que el reflejo auricular podría interferir con mecanismos de localización de sonidos (Chen y cols., 1995a). En la rata, un componente constante del RAS es la flexión de las orejas (el reflejo auricular) el cual posee latencia muy corta, sugiriendo que su vía neural en el tronco del encéfalo también sea corta (Cassella y Davis, 1986; Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989; Li y Frost, 1996). De hecho, se ha descrito que las motoneuronas auriculares responden al estímulo acústico con latencia de menos de 6 ms (Cassella y Davis, 1986).

Los resultados de nuestros experimentos de doble trazado y trazado retrógrado de los aferentes al subnúcleo medial del Mot7 confirman la existencia de una vía corta que lleva información auditiva para las motoneuronas auriculares por medio de las CRNs. Las CRNs poseen somas grandes ($\approx 35 \mu\text{m}$ de diámetro) y axones gruesos bien mielinizados de 5 a 8 μm de diámetro (Merchán y cols., 1988; Nodal y López, 2003). Estas características sugieren una rápida velocidad de conducción axónica, lo que es fundamental para neuronas responsables de un reflejo

de corta latencia como el RAS (López y cols., 1993; López y cols., 1999). Además, las amplitudes de respuesta del RAS obtenidas con el movimiento global del animal y los registros electromiográficos de los músculos auriculares (Pilz y cols., 1988) muestran fluctuaciones comunes en respuesta a la habituación e incremento de la intensidad del estímulo acústico (en el último caso la amplitud aumenta y la latencia disminuye). Sin embargo, el reflejo auricular se distingue del movimiento global del RAS porque el primero posee una latencia más corta y menor umbral de estimulación acústica (Francis, 1979; Pilz y cols., 1988). Las similitudes en las fluctuaciones y diferencias en la latencia o umbral pueden estar mediadas por una vía más corta partiendo de un núcleo pre-motor común a los dos componentes de la respuesta del RAS (Fig. 17, línea sólida gruesa). En el contexto del RAS, la proyección directa de las CRNs a las motoneuronas auriculares es coherente con las cortas latencias de la actividad electromiográfica registrada a partir de los músculos auriculares en respuesta a estímulos acústicos intensos (Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989). Además, las latencias de respuesta de las CRNs disminuyen según aumenta la intensidad del estímulo acústico (Sinex y cols., 2001) de forma semejante a la actividad electromiográfica registrada en la musculatura auricular (Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989) y diferente de la actividad registrada en la parte auditiva de PnC, donde la intensidad no produce cambios en la latencia cuando los estímulos son tonos puros.

A pesar del número relativamente pequeño de CRNs en cada raíz coclear, sus gruesos axones y numerosas colaterales podrían promover una rápida y virtualmente simultánea activación de varios centros de integración del RAS (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). Además, tras alcanzar el Mot7, las colaterales axónicas se ramifican y dan origen a colaterales más finas, como ocurre en el PnC. Esta ramificación parece ser característica del patrón de ramificación de las CRNs y puede permitir la propagación de la excitación de manera difusa a diversos elementos post-sinápticos.

En este estudio, los axones de las CRNs marcados con BDA, se distribuyeron con el mismo patrón previamente descrito (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). En estos estudios el foco no ha sido el análisis detallado de la proyección de colaterales axónicos en el Mot7. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos demostrado la conexión monosináptica entre las CRNs y las motoneuronas auriculares. De acuerdo con los criterios morfológicos e neuroquímicos (Gray, 1959; Uchizono, 1965; Gray, 1969; Somogyi y cols., 1986; Clements y cols., 1987), la forma circular de las vesículas sinápticas en los terminales marcados, juntamente con la asimetría de los complejos sinápticos observada en nuestro estudio, sugieren que los terminales axónicos de las CRN sean de naturaleza excitatoria. Esto es consistente con estudios de colaterales axónicos de las CRNs en el PnC (Nodal y López, 2003). De hecho, la reducción en amplitud del RAS tras la infusión de antagonistas de glutamato en el PnC (Ebert y Koch, 1992; Krase y cols., 1993) indica que el glutamato es el principal mediador relacionado con el RAS y las aferencias auditivas en PnC.

Hemos observado algunos terminales axónicos de las CRNs en yuxtaposición a motoneuronas no marcadas en la parte más ventral del subnúcleo medial del Mot7. Esta región esta ocupada por motoneuronas que inervan el músculo auricular transverso (Friauf y Herbert, 1985). Las motoneuronas marcadas retrógradamente que inervaban el músculo *levator auris longus* se sitúan inmediatamente dorsales y en parte solapadas con estas neuronas no marcadas. Estos dos músculos elevan, retraen, giran hacia delante y cambian la forma del pabellón auricular incrementando su convexidad (Greene, 1935; Friauf y Herbert, 1985). En roedores, gatos y murciélagos, estas modificaciones en la forma del pabellón auditivo son importantes para el alineamiento del eje acústico con la fuente de estímulos acústicos (Phillips y cols., 1982; Calford y Pettigrew, 1984; Jen y Chen, 1988; Chen y cols., 1995a). Los estímulos recibidos en el eje acústico (posición en el espacio en relación a la membrana timpánica donde en la mayor parte de

los casos un estímulo acústico produce el máximo nivel de presión de sonido), son amplificados, mientras que los demás no alineados con el eje acústico son atenuados. Las modificaciones en los sonidos determinadas por la superficie del pabellón auricular afectan las diferencias interaurales de tiempo y de niveles de presión de sonido, las cuales son fundamentales para los mecanismos de localización de los sonidos (Chen y cols., 1995a). Cuando un estímulo capaz de desencadenar el RAS ocurre, la orientación de la oreja hacia la fuente de emisión de sonidos podría mejorar la relación señal / ruido aumentando la ganancia para los estímulos que vienen de la misma dirección. De hecho, el reflejo auricular posee sensibilidad a la posición azimutal de la fuente de estímulos acústicos de tal manera que el reflejo disminuye mucho cuando el estímulo está a 90 grados de la línea media y es máximo cuando el estímulo está a 0 grados de la línea media (Li y Frost, 1996).

Otra área que debe ser considerada en relación al reflejo auricular es la parte del PnC que responde a la estimulación auditiva. A pesar de ser conocido que las CRNs proyectan bilateralmente al PnC (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003), nuestros experimentos de trazado realizados con control electrofisiológico solamente presentaron somas de las CRNs contralateralmente a los sitios de inyección en PnC. Este hecho puede estar relacionado al pequeño tamaño del sitio de inyección y la poca difusión del trazador así como al patrón de proyección de las CRNs al PnC que es más denso contralateralmente. En experimentos preliminares con grandes sitios de inyección que ocupaban casi todo PnC, hemos observado CRN somas retrógradamente marcados bilateralmente.

En nuestros experimentos la proyección del PnC al Mot7 fue bilateral con predominancia ipsilateral. Este resultado puede estar relacionado con los sitios de inyección en el PnC ya que en niveles más rostrales la conexión con el Mot7 ocurre predominantemente con el lado opuesto (Figura 2E y 2F). Los estudios con estimulación eléctrica han sugerido que la porción

ventrolateral de PnC era fundamental para el RAS (Yeomans y cols., 1993; Frankland y cols., 1995). Además, se ha demostrado que lesiones químicas y electrolíticas en este área eliminaban la respuesta global del RAS (Lee y cols., 1996). Tras la inyección de FG en el Mot7, hemos observado neuronas retrógradamente marcadas en la parte ventrolateral del PnC, dorsalmente al SOC y ventralmente al núcleo motor del nervio trigémino. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que han investigado la conectividad entre el Mot7 y la formación reticular (Jones y Yang, 1985; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Lingenhöhl y Friauf, 1994). Además, muchos colaterales de las CRN terminan bilateralmente en la parte ventrolateral del PnC y establecen conexiones directas con neuronas reticuloespinales (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). Además de las yuxtaposiciones axosomáticas entre los terminales axónicos de las CRNs y las neuronas de PnC fueron observadas varicosidades que terminaban en el neuropilo. Creemos que estos terminales establecen yuxtaposiciones axodentríticas con las neuronas de PnC. Esta hipótesis está apoyada en el estudio ultraestructural de los terminales axónicos de las CRNs en PnC (Nodal y López, 2003).

La descripción morfológica con la técnica de Golgi de los tipos neuronales del PnC ha indicado que las neuronas grandes de la parte ventrolateral de PnC, también denominada parte alfa, envían proyecciones reticuloespinales vía fascículo longitudinal medial y presentan el diámetro mayor entre 45 y 60 μm (Newman, 1985). La proyección reticuloespinal de la mitad rostral de la porción ventrolateral de PnC vía fascículo longitudinal medial ha sido confirmada por nuestros experimentos de inyección de trazador en el PnC.

La conexión indirecta entre las CRNs y las motoneuronas auriculares vía PnC puede reforzar la conexión directa y promover una suma temporal de potenciales excitatorios post-sinápticos en el Mot7 (Fig. 17, líneas discontinuas) para desencadenar o mantener la contracción de la musculatura auricular. Además, las proyecciones de la porción de PnC que responde a

estimulación auditiva a otros subnúcleos del Mot7, como el dorsal, el dorsolateral y el lateral, los cuales no reciben aferencias de las CRNs, podrían integrar la vía responsable por la contracción refleja de las pálpbras, así como para la contracción del músculo *levator labii superior*, en respuesta a la estimulación acústica (Caeser y cols., 1989). La conexión entre las CRNs y el PnC también puede tener un papel importante en el control de otros sistemas motores, como el trigeminal donde existe una evidente respuesta en el músculo temporal a los estímulos que desencadenan el RAS. Sin embargo, la contracción refleja del músculo temporal posee mayor umbral de estimulación acompañado de una mayor latencia cuando se compara con el reflejo auricular (Pilz y cols., 1988; Caeser y cols., 1989).

Nuestros resultados y los resultados de estudios previos (Henkel y Edwards, 1978; Hinrichsen y Watson, 1983; Isokawa-Akesson y Komisaruk, 1987; Herbert y cols., 1997) han demostrado que el VLTg y la región paralemniscal caudal envían eferencias para el subnúcleo medial del Mot7 y reciben aferencias de las CRNs (López y cols., 1999). La conectividad VLTg y de la región paralemniscal caudal sugiere que ambas estén relacionadas con el reflejo auricular asociado al RAS. El VLTg está relacionado con los reflejos de sobresalto táctil y acústico, pero no es uno de los núcleos fundamentales del circuito neural ya que lesiones electrolíticas en VLTg no abolían el RAS (Lee y cols., 1996).

La mayoría de los trabajos relacionados con el reflejo auditivo de sobresalto realizaron la medición de la amplitud de este reflejo llevando en consideración el movimiento global de todo el cuerpo del animal (Lee y cols., 1996; Pilz y Schnitzler, 1996). Así, los resultados provenientes de la contracción de la musculatura facial, que contribuye con una pequeña parte de la masa corpórea, pueden ser fácilmente enmascarados. Por ello, permanecen inciertos los papeles del PnC, del área tegmental ventrolateral y de la región paralemniscal caudal, en el componente auricular del RAS.

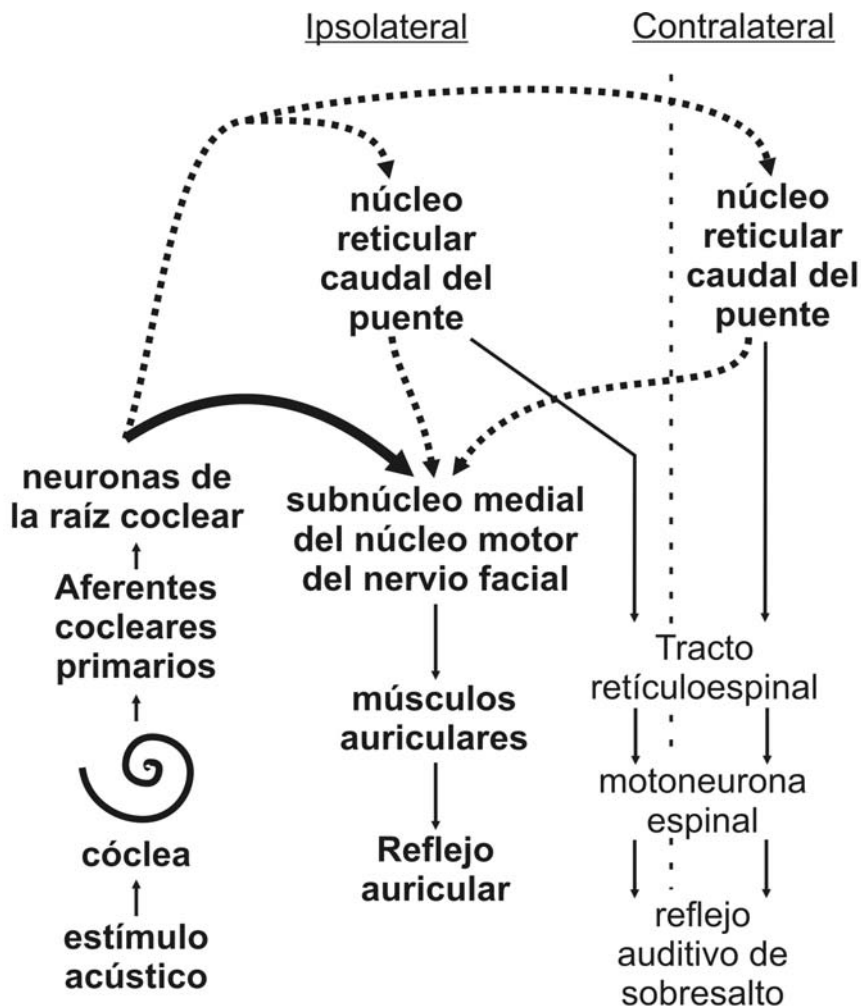


Figura 17 – Esquema de las conexiones directas e indirectas entre las CRNs y las motoneuronas auriculares, relacionadas con el reflejo auricular asociado al RAS. Las flechas indican la dirección de flujo de la vía que conecta la estimulación acústica al reflejo auricular. La flecha gruesa indica la conexión directa de las CRNs con las motoneuronas auriculares. Las flechas punteadas indican las conexiones indirectas entre las CRNs y las motoneuronas auriculares vía PnC.

Nos parece inverosímil que las CRNs sean las únicas responsables del reflejo auricular y todas sus modulaciones. De hecho, fue sugerido que estructuras como el núcleo tegmental pedúnculo pontino y el PnC son fundamentales en la inhibición por estímulo previo del reflejo auricular (Li y Frost, 2000). El PnC y el VLTg reciben aferencias auditivas de las CRNs (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003). Por tanto, es posible que las CRNs presenten una influencia directa e indirecta en el reflejo auricular. Para ampliar el conocimiento sobre el papel de cada uno

de estos centros pre-motores, serán necesarios estudios de lesión selectiva y evaluación electromiográfica del reflejo auricular.

CONCLUSIONES

6 – CONCLUSIONES

PRIMERA

Los núcleos relacionados con el reflejo auricular asociado al reflejo auditivo de sobresalto que envían aferencias al núcleo motor del nervio facial podrían realizar la integración sensoriomotora para hacer llegar la información auditiva a las motoneuronas auriculares. Estos núcleos son: el núcleo de la raíz coclear, el núcleo reticular caudal del puente, el área tegmental ventrolateral y la región paralemniscal caudal.

SEGUNDA

Las neuronas de la raíz coclear envían información a las motoneuronas auriculares del núcleo motor del nervio facial mediante una vía directa monosináptica y una vía indirecta disináptica a través del PnC. La conexión directa constituye la vía de conexión más corta para la llegada de información auditiva al subnúcleo medial del núcleo motor del nervio facial.

TERCERA

La porción del PnC que responde a estímulos acústicos está situada ventrolateralmente en los niveles más rostrales del núcleo reticular caudal del puente, extendiéndose rostralmente en la zona de transición con el núcleo reticular oral del puente.

CUARTA

La porción del PnC que responde a la estimulación auditiva recibe aferencias de las neuronas de la raíz coclear y envía eferencias a todos los subnúcleos del núcleo motor del nervio facial de ambos lados exceptuando el subnúcleo intermediario.

QUINTA

La porción ventrolateral del PnC responde a estímulos acústicos con latencias coherentes con el reflejo auricular asociado al reflejo auditivo de sobresalto. La latencia no varía en función de la intensidad cuando el estímulo es un tono puro, pero es menor con tonos puros de altas frecuencias.

SEXTA

En la región de PnC que recibe aferencias de las neuronas de la raíz, la actividad electrofisiológica aumenta en función de la intensidad cuando el estímulo es contralateral.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adams JC, Warr WB. 1976. Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injection of horseradish peroxidase into severed tracts. *J Comp Neurol* 170(1):107-121.
- Arts M, Bemelmans F, Cools A. 1998. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the feline retrorubral nucleus elicits orofacial dyskinesia. *Eur J Pharmacol* 349(1):23-31.
- Ashwell KW. 1982. The adult mouse facial nerve nucleus: morphology and musculotopic organization. *J Anat* 135(3):531-538.
- Brandt HM, Apkarian AV. 1992. Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J Neurosci Methods* 45(1-2):35-40.
- Brawer JR, Morest DK, Kane EC. 1974. The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 155(3):251-300.
- Caeser M, Ostwald J, Pilz PK. 1989. Startle responses measured in muscles innervated by facial and trigeminal nerves show common modulation. *Behav Neurosci* 103(5):1075-1081.
- Calford MB, Pettigrew JD. 1984. Frequency dependence of directional amplification at the cat's pinna. *Hear Res* 14(1):13-19.
- Carpenter MB, Cowie RJ. 1985. Transneuronal transport in the vestibular and auditory systems of the squirrel monkey and the arctic ground squirrel. I. Vestibular system. *Brain Res* 358(1-2):249-263.
- Cassella JV, Davis M. 1986. Habituation, prepulse inhibition, fear conditioning, and drug modulation of the acoustically elicited pinna reflex in rats. *Behav Neurosci* 100(1):39-44.
- Clements JR, Monaghan PL, Beitz AJ. 1987. An ultrastructural description of glutamate-like immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Brain Res* 421(1-2):343-348.
- Colonnier M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9(2):268-287.
- Courville J. 1966. Rubrobulbar fibres to the facial nucleus and the lateral reticular nucleus (nucleus of the lateral funiculus). An experimental study in the cat with silver impregnation methods. *Brain Res* 1(4):317-337.
- Chen QC, Cain D, Jen PH. 1995a. Sound pressure transformation at the pinna of *Mus domesticus*. *J Exp Biol* 198:2007-2023.

- Chen S, Aston-Jones G. 1998. Axonal collateral-collateral transport of tract tracers in brain neurons: false anterograde labelling and useful tool. *Neuroscience* 82(4):1151-1163.
- Chen XH, Itoh M, Miki T, Ichiyama M, Fujimoto Y, Sun W, Takeuchi Y. 1995b. Midbrain paralemniscal projections to the facial nucleus: an anatomical and immunohistochemical study. *Okajimas Folia Anat Jpn* 72(2-3):69-79.
- Choi D, Li D, Raisman G. 2002. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and DiI. *J Neurosci Methods* 117(2):167-172.
- Dauvergne C, Ndiaye A, Buisseret-Delmas C, Buisseret P, Vanderwerf F, Pinganaud G. 2004. Projections from the superior colliculus to the trigeminal system and facial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 478(3):233-247.
- Ebert U, Koch M. 1992. Glutamate receptors mediate acoustic input to the reticular brain stem. *Neuroreport* 3(5):429-432.
- Edwards SB, Henkel CK. 1978. Superior colliculus connections with the extraocular motor nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 179(2):451-467.
- Falls WM, King JS. 1976. The facial motor nucleus of the opossum: cytology and axosomatic synapses. *J Comp Neurol* 167(2):177-204.
- Fanardjian VV, Manvelyan LR. 1987. Mechanisms regulating the activity of facial nucleus motoneurons--IV. Influences from the brainstem structures. *Neuroscience* 20(3):845-853.
- Fanardjian VV, Manvelyan LR, Kasabyan SA. 1983. Mechanisms regulating the activity of facial nucleus motoneurons--1. Antidromic activation. *Neuroscience* 9(4):815-822.
- Francis RL. 1979. The Preyer reflex audiogram of several rodents, and its relation to the "absolute" audiogram in the rat. *J Aud Res* 19(3):217-233.
- Frankland PW, Scott BW, Yeomans JS. 1995. Axons and synapses mediating electrically evoked startle: collision tests and latency analysis. *Brain Res* 670(1):97-111.
- Friauf E, Herbert H. 1985. Topographic organization of facial motoneurons to individual pinna muscles in rat (*Rattus rattus*) and bat (*Rousettus aegyptiacus*). *J Comp Neurol* 240(2):161-170.
- Ghez C. 1975. Input-output relations of the red nucleus in the cat. *Brain Res* 98(1):93-308.

- Gomez-Nieto R, Horta-Junior JA, Castellano O, Herrero-Turrion MJ, Rubio ME, Lopez DE. 2008a. Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle. *Neuroscience*.
- Gomez-Nieto R, Rubio ME, Lopez DE. 2008b. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. *J Comp Neurol* 506(3):452-468.
- Gray EG. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420-433.
- Gray EG. 1969. Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog Brain Res* 31:141-155.
- Greene EC. 1935. *Anatomy of the rat*. Philadelphia: Transactions of the American Philosophical Society.
- Gregory J. 2002. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Eugene: Molecular Probes.
- Grofova I, Keane S. 1991. Descending brainstem projections of the pedunclopontine tegmental nucleus in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 184(3):275-290.
- Hancock MB. 1982. DAB-Nikel Substrate for the differential immunoperoxidase staining of nerve fibers and fiber terminals. *J Histochem Cytochem* 30(6):578.
- Hancock MB. 1984. Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. *J Histochem Cytochem* 32(3):311-314.
- Harris LR, Blakemore C, Donaghy M. 1980. Integration of visual and auditory space in the mammalian superior colliculus. *Nature* 288(5786):56-59.
- Harrison JM, Warr WB, Irving RE. 1962. Second order neurons in the acoustic nerve. *Science* 138:893-895.
- Henkel CK. 1981. Afferent sources of a lateral midbrain tegmental zone associated with the pinnae in the cat as mapped by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 203(2):213-226.
- Henkel CK, Edwards SB. 1978. The superior colliculus control of pinna movements in the cat: possible anatomical connections. *J Comp Neurol* 182(4 Pt 2):763-776.
- Herbert H, Klepper A, Ostwald J. 1997. Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 196(3):235-259.

- Hinrichsen CF, Watson CD. 1983. Brain stem projections to the facial nucleus of the rat. *Brain Behav Evol* 22(2-3):153-163.
- Hinrichsen CF, Watson CD. 1984. The facial nucleus of the rat: representation of facial muscles revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat Rec* 209(3):407-415.
- Hof PR, Glezer, II, Archin N, Janssen WG, Morgane PJ, Morrison JH. 1992. The primary auditory cortex in cetacean and human brain: a comparative analysis of neurofilament protein-containing pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 146(1):91-95.
- Hof PR, Morrison JH. 1995. Neurofilament protein defines regional patterns of cortical organization in the macaque monkey visual system: a quantitative immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 352(2):161-186.
- Holstege G. 2002. Emotional innervation of facial musculature. *Mov Disord* 17 Suppl 2:S12-16.
- Holstege G, Tan J, van Ham J, Bos A. 1984. Mesencephalic projections to the facial nucleus in the cat. An autoradiographical tracing study. *Brain Res* 311(1):7-22.
- Horlington M. 1968. A method for measuring acoustic startle response latency and magnitude in rats: detection of a single stimulus effect using latency measurements. *Physiol Behav* 3:839-844.
- Horta-Junior JA, Tamega OJ, Cruz-Rizzolo RJ. 2004. Cytoarchitecture and musculotopic organization of the facial motor nucleus in *Cebus apella* monkey. *J Anat* 204(Pt 3):175-190.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 75(6):816-821.
- Isa T, Sasaki S. 2002. Brainstem control of head movements during orienting; organization of the premotor circuits. *Prog Neurobiol* 66(4):205-241.
- Isokawa-Akesson M, Komisaruk BR. 1987. Difference in projections to the lateral and medial facial nucleus: anatomically separate pathways for rhythmical vibrissa movement in rats. *Exp Brain Res* 65(2):385-398.
- Jen PH, Chen DM. 1988. Directionality of sound pressure transformation at the pinna of echolocating bats. *Hear Res* 34(2):101-117.
- Jones BE, Yang TZ. 1985. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242(1):56-92.

- Karnovsky MJ, Roots L. 1964. A "Direct-Coloring" Thiocholine Method for Cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12:219-221.
- Kitai ST, Tanaka T, Tsukahara N, Yu H. 1972. The facial nucleus of cat: antidromic and synaptic activation and peripheral nerve representation. *Exp Brain Res* 16(2):161-183.
- Koch M. 1999. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59(2):107-128.
- Krase W, Koch M, Schnitzler HU. 1993. Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response. *Neuroreport* 4(1):13-16.
- Landis C, Hunt WA. 1939. The startle pattern. New York: Ferrar & Rinehart.
- Lee Y, López DE, Meloni EG, Davis M. 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci* 16(11):3775-3789.
- Li L, Frost BJ. 1996. Azimuthal sensitivity of rat pinna reflex: EMG recordings from cervicoauricular muscles. *Hear Res* 100(1-2):192-200.
- Li L, Frost BJ. 2000. Azimuthal directional sensitivity of prepulse inhibition of the pinna startle reflex in decerebrate rats. *Brain Res Bull* 51(1):95-100.
- Lingenhöhl K, Friauf E. 1992. Giant neurons in the caudal pontine reticular formation receive short latency acoustic input: an intracellular recording and HRP-study in the rat. *J Comp Neurol* 325(4):473-492.
- Lingenhöhl K, Friauf E. 1994. Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J Neurosci* 14(3 Pt 1):1176-1194.
- López DE, Merchán MA, Bajo VM, Saldana E. 1993. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: Merchán MA, editor. *The mammalian cochlear nuclei: organization and function*. New York: Plenum Press. p 291-301.
- López DE, Saldana E, Nodal FR, Merchán MA, Warr WB. 1999. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. *J Comp Neurol* 415(2):160-174.
- Lorente de Nó R. 1926. Études sur l'anatomie et la physiologie du labyrinthe de l'oreille et du VIII nerf. Deuxième partie: quelques données au sujet de l'anatomie des organes sensoriels du labyrinthe. *Travaux. Lab Rech Biol Univ Madrid* 24:53-153.
- Lorente de Nó R. 1933a. Anatomy of the eighth nerve III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *laryngoscope* 43:327-350.

- Lorente de Nó R. 1933b. Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. *Laryngoscope* 43:1-38.
- Martin GF, Cabana T, Waltzer R. 1983. Anatomical demonstration of the location and collateralization of rubral neurons which project to the spinal cord, lateral brainstem and inferior olive in the North American opossum. *Brain Behav Evol* 23(3-4):93-109.
- Martin MR, Lodge D. 1977. Morphology of the facial nucleus of the rat. *Brain Res* 123(1):1-12.
- May PJ, Vidal PP, Baker R. 1990. Synaptic organization of tectal-facial pathways in cat. II. Synaptic potentials following midbrain tegmentum stimulation. *J Neurophysiol* 64(2):381-402.
- Merchán MA, Collia F, López DE, Saldana E. 1988. Morphology of cochlear root neurons in the rat. *J Neurocytol* 17(5):711-725.
- Mesulam MM. 1982. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways - Axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In: Mesulam MM, editor. *Tracing neuronal connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley and Sons. p 1-151.
- Mogoseanu D, Smith AD, Bolam JP. 1994. Monosynaptic innervation of facial motoneurons by neurons of the parvicellular reticular formation. *Exp Brain Res* 101(3):427-438.
- Naumann T, Hartig W, Frotscher M. 2000. Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. *J Neurosci Methods* 103(1):11-21.
- Newman DB. 1985. Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. II. Pontine and mesencephalic nuclei. *J Hirnforsch* 26(4):385-418.
- Nodal FR, López DE. 2003. Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *J Comp Neurol* 460(1):80-93.
- Novikova L, Novikov L, Kellerth JO. 1997. Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J Neurosci Methods* 74(1):9-15.
- Ochs S. 1972. Fast transport of materials in mammalian nerve fibers. *Science* 176(32):252-260.
- Osen KK, López DE, Slyngstad TA, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1991. GABA-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. *J Neurocytol* 20(1):17-25.

- Panneton WM, Martin GF. 1983. Brainstem projections to the facial nucleus of the opossum. A study using axonal transport techniques. *Brain Res* 267(1):19-33.
- Paxinos G, Watson C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: the new coronal set - 161 diagrams*. San Diego: Academic Press.
- Pellet J, Weiss M, Gourdon MJ. 1983. Harmaline effects on the sensory-motor reactivity: modifications of the acoustic startle pattern. *Pharmacol Biochem Behav* 19(3):527-534.
- Phillips DP, Calford MB, Pettigrew JD, Aitkin LM, Semple MN. 1982. Directionality of sound pressure transformation at the cat's pinna. *Hear Res* 8(1):13-28.
- Pilz PK, Caeser M, Ostwald J. 1988. Comparative threshold studies of the acoustic pinna, jaw and startle reflex in the rat. *Physiol Behav* 43(4):411-415.
- Pilz PK, Schnitzler HU. 1996. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. *Neurobiol Learn Mem* 66(1):67-79.
- Populin LC, Yin TC. 1995. Topographical organization of the motoneuron pools that innervate the muscles of the pinna of the cat. *J Comp Neurol* 363(4):600-614.
- Puigdellivol-Sanchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C. 1998. Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold, and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection. *J Neurosci Methods* 86(1):7-16.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103(1):23-37.
- Richmond FJ, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB. 1994. Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J Neurosci Methods* 53(1):35-46.
- Saper CB. 1999. Image is everything. *J Comp Neurol* 412(3):381-382.
- Schenk MP, Manning RJ, Paalman MH. 1999. Going digital: image preparation for biomedical publishing. *Anat Rec* 257(4):128-136.
- Schmued LC, Heimer L. 1990. Iontophoretic injection of fluoro-gold and other fluorescent tracers. *J Histochem Cytochem* 38(5):721-723.
- Senba E, Tohyama M. 1983a. Leucine-enkephalin-containing neuron system in the facial nucleus of the rat with special reference to its fine structure. *Brain Res* 274(1):17-23.
- Senba E, Tohyama M. 1983b. Reticulo-facial enkephalinergic pathway in the rat: an experimental immunohistochemical study. *Neuroscience* 10(3):831-839.

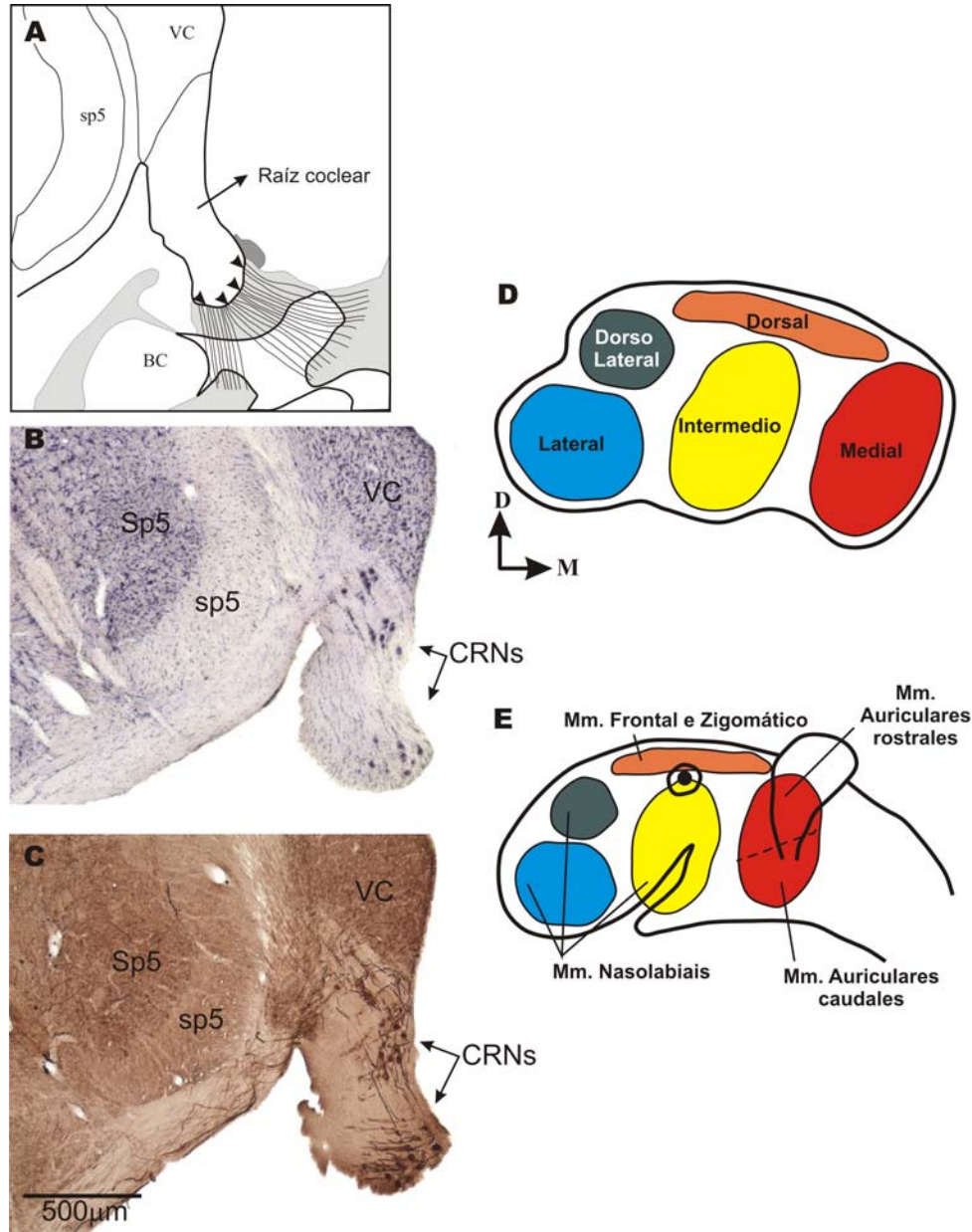
- Shammah-Lagnado SJ, Costa MS, Ricardo JA. 1992. Afferent connections of the parvocellular reticular formation: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 50(2):403-425.
- Sherwood CC. 2005. Comparative anatomy of the facial motor nucleus in mammals, with an analysis of neuron numbers in primates. *The anatomical record* 287(1):1067-1079.
- Sinex DG, López DE, Warr WB. 2001. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. *Hear Res* 158(1-2):28-38.
- Somogyi P, Halasy K, Somogyi J, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. 1986. Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neuroscience* 19(4):1045-1050.
- Strutz J. 1982a. The origin of efferent labyrinthine fibres: a comparative study in vertebrates. *Arch Otorhinolaryngol* 234(2):139-143.
- Strutz J. 1982b. The origin of efferent vestibular fibres in the guinea pig. A horseradish peroxidase study. *Acta Otolaryngol* 94(3-4):299-305.
- Takeuchi Y, Nakano K, Uemura M, Matsuda K, Matsushima R, Mizuno N. 1979. Mesencephalic and pontine afferent fiber system to the facial nucleus in the cat: a study using the horseradish peroxidase and silver impregnation techniques. *Exp Neurol* 66(2):330-342.
- Taniguchi I. 1985. Echolocation Sounds and Hearing of the Greater Japanese Horseshoe Bat (*Rhinolophus-Ferrumequinum-Nippon*). *J Comp Physiol A* 156(2):185-188.
- Travers JB, Norgren R. 1983. Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 220(3):280-298.
- Uchizono K. 1965. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature* 207(997):642-643.
- Veenman CL, Reiner A, Honig MG. 1992. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods* 41(3):239-254.
- Vetter DE, Mugnaini E. 1992. Distribution and dendritic features of three groups of rat olivocochlear neurons. A study with two retrograde cholera toxin tracers. *Anat Embryol (Berl)* 185(1):1-16.
- Vidal PP, May PJ, Baker R. 1988. Synaptic organization of the tectal-facial pathways in the cat. I. Synaptic potentials following collicular stimulation. *J Neurophysiol* 60(2):769-797.

- von Krosigk M, Smith AD. 1991. Descending Projections from the Substantia Nigra and Retrorubral Field to the Medullary and Pontomedullary Reticular Formation. *Eur J Neurosci* 3(3):260-273.
- Wan XC, Trojanowski JQ, Gonatas JO. 1982. Cholera toxin and wheat germ agglutinin conjugates as neuroanatomical probes: their uptake and clearance, transganglionic and retrograde transport and sensitivity. *Brain Res* 243(2):215-224.
- Warr WB. 1992. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. *The mammalian auditory pathway: neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag. p 410-448.
- Watson CR, Sakai S, Armstrong W. 1982. Organization of the facial nucleus in the rat. *Brain Behav Evol* 20(1-2):19-28.
- Weiss P, Hiscoe HB. 1948. Experiments on the Mechanism of Nerve Growth. *J Exp Zool* 107(3):315-395.
- Welt C, Abbs JH. 1990. Musculotopic organization of the facial motor nucleus in *Macaca fascicularis*: a morphometric and retrograde tracing study with cholera toxin B-HRP. *J Comp Neurol* 291(4):621-636.
- Wessendorf MW. 1991. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res* 553(1):135-148.
- White JS, Warr WB. 1983. The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J Comp Neurol* 219(2):203-214.
- Yeomans JS, Frankland PW. 1996. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Brain Res Rev* 21(3):301-314.
- Yeomans JS, Hempel CM, Chapman CA. 1993. Axons and synapses mediating startle-like responses evoked by electrical stimulation of the reticular formation in rats: symmetric and asymmetric collision effects. *Brain Res* 617(2):309-319.

ANEXOS

ANEXOS

A – Figuras ilustrativas de las neuronas de la raíz coclear y de la organización musculotópica del núcleo motor del nervio facial



Anexo A - Raíz coclear, las neuronas de la raíz coclear (CRNs) y la organización musculotópica del Mot7. A: esquema de un corte coronal del tronco encefálico y parte de la espira basal de la cóclea preparado con base en el trabajo de Merchán y cols., (1988). Las cabezas de flecha indican el borde glial que delimita la raíz coclear. B y C: fotomicrografías de cortes coronais de la raíz coclear ilustrando las CRNs teñidos con la técnica de Nissl (B) o con el protocolo inmunohistoquímico para neurofilamentos H SMI-32 (C). D y E: esquema de la citoarquitectura (D) y de la musculotopía (E) del Mot7 en la rata, el nivel del tercio medio rostro-caudal, según Watson y cols. (1982).

B - Casos experimentales

CASO	TRAZADOR	SITIO DE INYECCIÓN	PROCESAMIENTO
1	FG	Subnúcleo medial do núcleo motor del nervio facial	Microscopía óptica
2	FG	Subnúcleo medial do núcleo motor del nervio facial	Microscopía óptica
3	FG	Subnúcleo medial do núcleo motor del nervio facial	Microscopía óptica
4	FG	Subnúcleo medial do núcleo motor del nervio facial	Microscopía óptica
5	FG	Subnúcleo medial do núcleo motor del nervio facial	Microscopía óptica
6	BDA	Raíz coclear	Microscopía óptica
	FG	Músculo auricular <i>levator auris longus</i>	
7	BDA	Raíz coclear	Microscopía óptica
	FG	Músculo auricular <i>levator auris longus</i>	
8	BDA	Raíz coclear	Microscopía óptica
	FG	Músculo auricular <i>levator auris longus</i>	
9	BDA	Raíz coclear	Microscopía eletrónica de transmisión
	FG	Músculo auricular <i>levator auris longus</i>	
10	BDA	Raíz coclear	Microscopía eletrónica de transmisión
	FG	Músculo auricular <i>levator auris longus</i>	
11	registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
12	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
13	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
14	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
15	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
16	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
17	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica
18	BDA+registro	Núcleo reticular caudal del puente	Microscopía óptica

Anexo B - Tabla 1 – Casos experimentales utilizados en este estudio.

C - Técnicas para estudio citoarquitectónico

Previamente al estudio del material experimental, fueron realizadas preparaciones histológicas para estudio citoarquitectónico y elaboración de esquemas para ilustración de los resultados. Para esto, fueron perfundidos dos animales sin manipulación experimental previa. Sus encéfalos fueron colectados y seccionados de la misma forma descrita anteriormente.

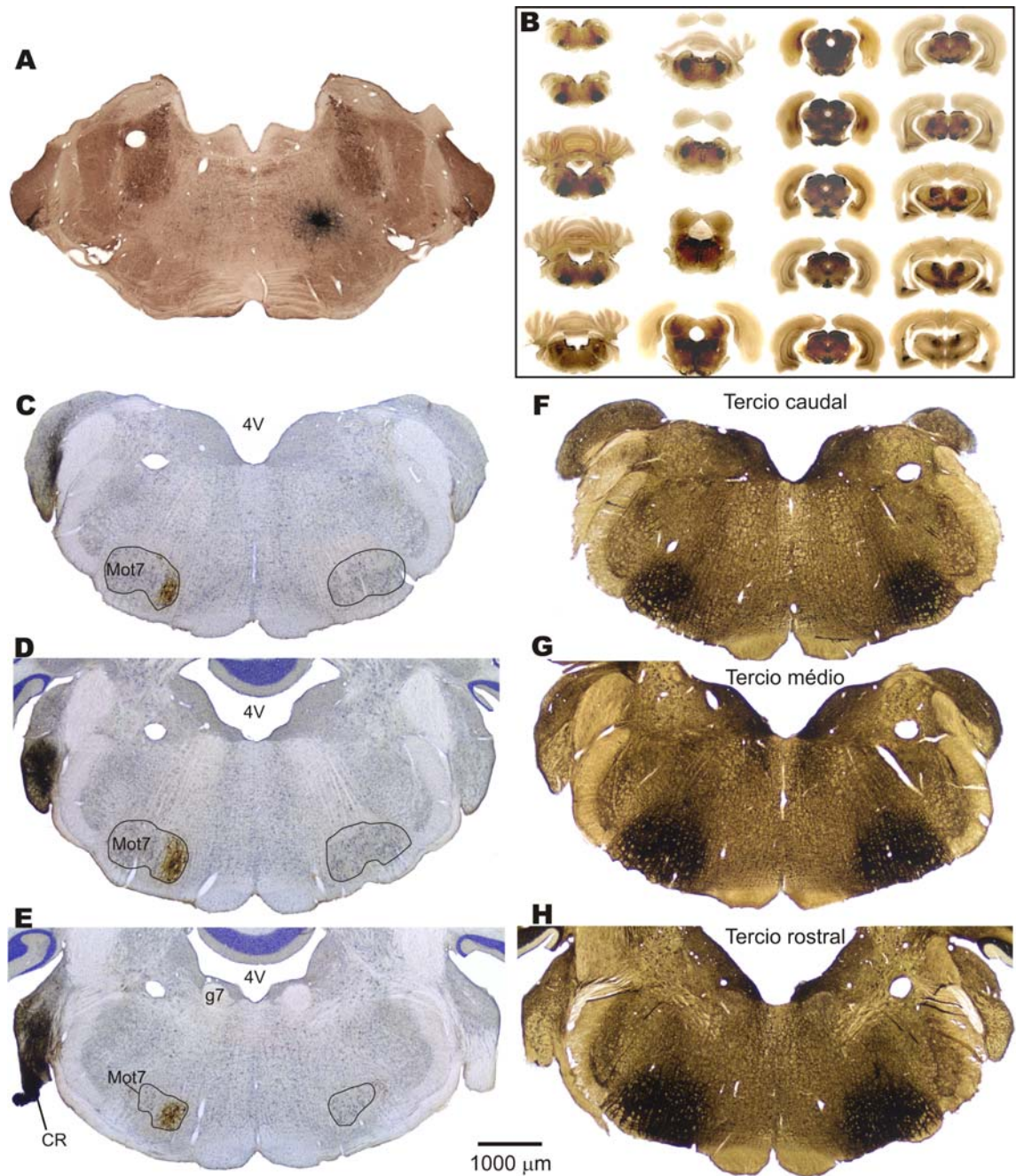
Fueron empleadas las siguientes técnicas: una variación método de Nissl, método histoquímico para visualización de la acetilcolinesterasa e inmunohistoquímica para neurofilamentos SMI-32.

El método de Nissl consiste en realizar la deshidratación de los cortes montados en láminas mediante baños de alcohol etílico de concentración creciente (de 50% la 100%), disolución de los lípidos con dos baños de xilol, rehidratación de los cortes mediante baños de alcohol etílico de concentración decreciente (de 100% hasta el agua destilada), coloración con violeta de cresilo (Sigma #C-1791) o tionina (Fisher #T-409), nueva deshidratación con alcoholes etílicos, sumersión en tres baños de xilol y montaje del cubre objetos con Entellan®neu (Merck).

El método histoquímico para acetilcolinesterasa consiste de una modificación de la técnica descrita por Karnovsky y Roots (1964). Esta técnica posibilita la visualización más nítida de los límites citoarquitecturales de los núcleos colinérgicos. La técnica consiste en lavar los cortes en agua destilada y incubados en una solución compuesta por sulfato de cobre 0,05% (Sigma #C-7631), glicina 0,075% (Sigma #G-7126), acetil tiocolina iodada 0,115% (Sigma #La-5751), tetraisopropil pirofosforamida 0,00274% (Sigma #T-1505) en tapón acetato 0,05M pH 5,0 por 75 minutos a la temperatura ambiente. Luego, los cortes son lavados, incubados en solución de sulfuro de sodio a 1,5% (Sigma #S-2006) pH 5,0 por 2 minutos, lavados nuevamente en agua destilada y incubados en solución de nitrato de plata 1% (Sigma #S-8157) por 2 minutos. En la

secuencia, los cortes fueron lavados en agua destilada, montados en láminas y cubiertos utilizando Entellan®neu (Merck) como medio de montaje.

El protocolo de inmunohistoquímica para neurofilamentos SMI-32 marca neurofilamentos del citoesqueleto, presentes en gran cantidad en neuronas de proyección, como las neuronas piramidales (Hof y cols., 1992; Hof y Morrison, 1995) o las neuronas pseudo-unipolares del núcleo mesencefálico del nervio trigémino. Por medio de esta técnica, se presentan bien marcadas las fibras nerviosas y las neuronas grandes como las neuronas retículo-espinales o las CRNs. El protocolo consistió en la inhibición de la peroxidase endógena con una solución de agua oxigenada a 0,18% y metanol la 65% en tapón Tris 0,05M pH 7,6 preparado en solución de NaCl 0,9% con Triton X-100 a 0,5%. En la secuencia, los cortes fueron incubados en anticuerpo primario anti-neurofilamento H SMI-32 (1:8000), obtenido en ratón, por 48 horas a 4°C. Posteriormente, las secciones fueron incubadas por 120 minutos en anticuerpo secundario anti-ratón (1:200) obtenido en caballo, seguido por la incubación en complejo ABC (1:200) y por último en la solución para reacción histoquímica empleando DAB como cromógeno. Esta reacción fue realizada en tapón Tris 0,05M, pH 7,6 con 0,07% de DAB y 0,003% del agua oxigenada. Posteriormente, los cortes fueron montados, contrastados con una solución de tetróxido de ósmio 0,02% en tapón cacodilato 0,1M pH 7,6 por 10 minutos, deshidratados y cubiertos utilizando Entellan®neu (Merck) como medio de montaje.

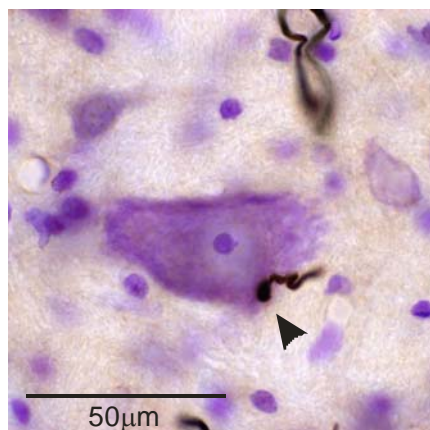


Anexo C - Técnicas de citoarquitectura. A: Corte procesado según el protocolo inmunohistoquímico para neurofilamentos H SMI-32 donde se observa en sitio de inyección de BDA en PnC. B: Conjunto de secciones ordenadas rostrocaudalmente teñidas con el protocolo histoquímico para la acetilcolinesterasa. En la columna de la izquierda (C, D y E), los cortes fueron contracolorados con violeta de cresil tras la reacción histoquímica para visualizar ambos los trazadores: FG, inyectado en el músculo levantador largo de oreja y BDA, inyectado en la raíz coclear. Las figuras indican la localización del marcaje retrógrada, en tres niveles rostro-caudales: caudal (C), medio (D) y rostral (E). La línea marca el límite externo del Mot7. En la columna de la derecha (F, G y H), cortes equivalentes a los de la columna de la izquierda teñidas con el protocolo para la acetilcolinesterasa. La distancia entre los cortes de cada columna en el eje rostro-caudal es de 400 μm . Abreviaturas: CR, raíz coclear del nervio vestibulo-coclear; 4V, cuarto ventrículo; Mot7, núcleo motor del nervio facial, g7, rodilla del nervio facial.

D – Morfometría de somas en PnC

tamaño	area		perimetro		elipse mayor		elipse menor		diámetro máximo	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
medio	279,78	87,05	72,10	12,05	25,52	5,35	13,84	2,66	27,41	5,16
grande	734,50	361,59	124,46	23,47	47,00	6,30	19,61	8,84	47,55	6,32

Anexo D - Tabla 2 - Morfometría de somas retrógradamente marcados en PnC tras la inyección de FG en el subnúcleo medial del Mot7. Todas las mediciones lineares están expresadas en micrómetros. Las columnas “elipse mayor” y “elipse menor” presentan mediciones de los respectivos ejes de la elipse que mejor se adapta al soma



medida	Área (μm^2)	Perimetro	Elipse mayor	Elipse menor	Diámetro máximo
1	1194,29	145,50	49,23	30,88	56,45
2	1201,06	140,34	53,66	28,49	56,23
3	863,70	111,19	40,53	27,12	40,96
4	949,34	126,03	42,66	28,33	48,90
5	360,26	74,49	26,44	17,34	27,17
6	1245,83	170,52	71,87	22,07	72,27
7	744,48	107,34	38,22	24,80	42,15
8	998,48	128,89	49,48	25,69	51,37

Resultados totales	Área	Perimetro	Elipse mayor	Elipse menor	Diámetro máximo
Media	944,68	125,54	46,52	25,59	49,44
Desvio típico	295,16	28,77	13,27	4,26	13,31
Valor mínimo	360,27	74,50	26,44	17,35	27,17
Valor máximo	1245,83	170,52	71,87	30,88	72,27

Anexo D - Tabla 3 - Morfometría de somas post-sinápticos a los terminales de las CRNs en PnC. Todas las mediciones lineares están expresadas en micrómetros. Las columnas “elipse mayor” y “elipse menor” presentan mediciones de los respectivos ejes de la elipse que mejor se adapta al soma

E – Datos de los registros electrofisiológicos representados en las Figuras 11 y 12

Variable dependiente: latencia

tipo de estímulo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
tono puro	4,084	,051	3,983	4,186
ruido	4,500	,098	4,307	4,693

Anexo E – 2 – Datos de la Figura 11A

Variable dependiente: latencia

situación del estímulo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
izquierda (contralateral)	4,149	,069	4,013	4,284
derecha (ipsilateral)	3,500	,282	2,942	4,058
bilateral	4,117	,089	3,940	4,293

Anexo E – 3 – Datos de la Figura 11B

Variable dependiente: latencia

frecuencia	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0.4 - 1.0	4,317	,107	4,106	4,528
1.3 - 2.5	4,140	,097	3,949	4,331
3.5 - 5.0	4,048	,106	3,839	4,256
6.0 - 16.0	3,846	,135	3,581	4,111
20.0 - 35.0	3,429	,259	2,917	3,940
ruido	4,574	,100	4,377	4,772

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11C

Variable dependiente: latencia

intensidad	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
60	3,950	,118	3,716	4,184
70	4,077	,104	3,872	4,282
80	4,139	,088	3,965	4,313
90	4,135	,087	3,963	4,307
100	4,000	,146	3,710	4,290

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11D

Variable dependiente: latencia

Atenuación	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
5	3,909	,244	3,417	4,401
10	4,375	,286	3,798	4,952
20	4,500	,256	3,984	5,016
30	4,667	,269	4,123	5,211
>30	5,250	,286	4,673	5,827

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 11E

Periodo	situación del estímulo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
1 - 25ms	izquierda (contralateral)	86,997	6,166	74,778	99,215
	derecha (ipsilateral)	39,920	22,572	-4,807	84,647
	bilateral	132,500	7,788	117,068	147,932
26 - 75ms	izquierda (contralateral)	25,670	3,018	19,690	31,651
	derecha (ipsilateral)	24,720	11,048	2,827	46,613
	bilateral	35,381	3,812	27,827	42,935
76 – 120 ms	izquierda (contralateral)	10,434	1,146	8,163	12,704
	derecha (ipsilateral)	9,911	4,195	1,599	18,223
	bilateral	10,257	1,447	7,389	13,124

Anexo E – 1 – Datos de las Figuras 12A y 12B

Periodo	intensidad global	situación del estímulo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite inferior	Límite superior
1 - 25ms	60	izquierda (contralateral)	41,044	15,927	9,519	72,570
		derecha (ipsilateral)	66,800	47,780	-27,777	161,377
		bilateral	117,760	15,109	87,852	147,668
	70	izquierda (contralateral)	69,187	12,337	44,767	93,606
		derecha (ipsilateral)	64,000	47,780	-30,577	158,577
		bilateral	139,840	15,109	109,932	169,748
	80	izquierda (contralateral)	84,241	10,961	62,543	105,938
		derecha (ipsilateral)	54,267	27,586	-,337	108,871
		bilateral	136,353	11,588	113,415	159,291
	90	izquierda (contralateral)	84,435	9,963	64,714	104,155
		derecha (ipsilateral)	44,300	23,890	-2,989	91,589
		bilateral	125,262	13,252	99,031	151,493
	100	izquierda (contralateral)	124,840	15,109	94,932	154,748
		derecha (ipsilateral)	23,200	47,780	-71,377	117,777
		bilateral	110,100	33,785	43,224	176,976

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12C

Periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
76 – 120 ms	12,133	2,010	8,084	16,181
1 – 25 ms	84,417	11,016	62,229	106,604
26 – 75 ms	26,365	5,182	15,927	36,802

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12D

Periodo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
76 – 120 ms	11,636	1,090	9,432	13,840
1 – 25 ms	46,769	2,855	40,993	52,544
26 – 75 ms	21,148	1,480	18,155	24,141

Anexo E – 4 – Datos de la Figura 12E