

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de ciencias morfológicas



**Estudio experimental de las vías del dolor de la región
de las vibrisas en el cobaya tricolor (*Cavia porcellus*)**

Memoria presentada por Silvia Novío Mallón
para optar al Título de Doctor

Santiago de Compostela, Septiembre 2007

D. Luis Alberto Gómez Segade, Catedrático de Histología, y, **D. Juan Antonio Suárez Quintanilla**, Profesor Titular de Anatomía y Embriología Humanas, ambos del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que Dña. **Silvia Novío Mallón**, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral, titulada “**Estudio experimental de las vías del dolor de la región de las vibrisas en el cobaya tricolor (*Cavia porcellus*)**”.

Que consideramos que dicho trabajo está finalizado y reúne todas las condiciones necesarias para que pueda procederse a su lectura y defensa.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Santiago de Compostela a 21 de Septiembre de 2007.

Fdo.:

Prof. Luis Alberto Gómez Segade

Fdo.:

Prof. Juan Antonio Suárez Quintanilla

A mi hita

Agradecimientos

El día más añorado por cualquier doctorando es cuando llega el momento de dar las gracias a toda aquella gente que ha ayudado a que el trabajo de los últimos años no resultase tan arduo e, incluso en algunas ocasiones, enormemente desolador. Os estaréis preguntando el porqué hago esta afirmación, pero la respuesta es tan simple que hasta podría obviarse: *tenemos una prueba fehaciente de que hemos alcanzado la meta que nos habíamos propuesto*. Después de esta sutil apreciación, que habrá servido para que una vez más me dierais la razón, centrémonos en el tema que nos atañe.

En primer lugar, me gustaría manifestar mi más sentido agradecimiento a mis codirectores Luis A. Gómez Segade y Juan A. Suárez Quintanilla. Las numerosas aportaciones científicas que de una manera desinteresada me han transmitido, la ilusión por el trabajo realizado a diario, la infatigable paciencia que han tenido conmigo desde el primer día, y los valores inculcados en estos años son solamente minucias en comparación con las numerosas virtudes que los caracterizan. Sólo me queda decir Gracias por el esfuerzo realizado y las horas de ocio robadas, espero que el esfuerzo haya valido la pena.

Asimismo, he de agradecerle al Departamento de Ciencias Morfológicas los medios técnicos facilitados, sin los cuales el trabajo de laboratorio no hubiera podido llevarse a cabo.

Por supuesto a mi familia. Mi *hermana*, quien me ha ensañado que el querer es poder y que detrás de cada pregunta siempre se esconde un porqué. Ella ha sido un ejemplo de superación, un pilar de apoyo ante las adversidades acaecidas en toda mi vida, una cómplice de las “fechorías” propias de la infancia y no tan de la infancia, una persona emprendedora y a la cual poder recurrir ante cualquier infortunio hallando siempre soluciones, pero sobretodo... ¿por qué? la pregunta más esperada y que más quebraderos de cabeza y risas me ha suscitado. Mi *madre*, por su ingenuidad,

perseverancia, paciencia y comprensión, porque es un modelo a seguir en todas las facetas de la vida, nadie podría haberlo hecho mejor ¿y luego? Luego no sé. Mi *padre*, porque la ley de Ohm marcó el comienzo del duro camino. Mis *abuelas*, quienes con sus frases célebres, tales como “¡Forza Roma!”, “Dalle coso coa mulata” y “El dormir es interesante, el dormir es estudiar” han conseguido transmitirme las fuerzas necesarias y arrancarme una sonrisa cuando más lo he necesitado.

Por último, a todas aquellas personas que me han apoyado en todos estos años.

A *Peter*, por haber sabido estar a la altura de las circunstancias en todo momento. Una persona muy noble, sencilla y comprensible, a la que nunca le ha faltado la sonrisa y la cual me ha enseñado que la felicidad plena no es una utopía. Por fin ha llegado el momento de compensarte.

A mi *Juana de Arco*, mi confidente y mi amiga, tus vivencias y consejos han sido un manual al que recurrir siempre que he perdido el norte. Perdón por aturdirte, pero sabes que cuando te riño es por tu bien.

A la *persona más hippie* de toda la facultad por haber pincelado cada uno de los días de este duro camino con color, risas y alegría, y por haberme hecho ver que las penas compartidas tocan a menos. Ha llegado el día de cumplir tu promesa. Mañana es la palabra del perezoso, sonrío como acostumbras a hacerlo a diario.

A *Cerdeña*, esa isla sin ubicación clara, porque en ella he hallado una amiga al abrirme su corazón y brindarme todo su apoyo sin esperar nada a cambio. Creo que ya ha llegado el momento de que vayamos a cenar.

A *David*, porque no todo el mundo puede presumir de tener un amigo cuadrúpedo y además de serie. Tus defectos matutinos han servido para darme cuenta de lo que se te echa en falta. Muy pronto tendrás que hacer de guía.

A *Vanesa*, quien pese a la distancia, ha hecho que siempre la sintiese muy cercana. Los empujoncitos finales me han enseñado algo.

A *Mila*, porque no hay otra como tú. Una persona que desde el principio se ha preocupado por encauzar mi camino, siempre dispuesta a ayudar y a hacer que la vida de los demás resulte más sencilla. Ha sido una gran suerte el haberte conocido.

A mi *tío*, porque me ha demostrado que aún existe gente de palabra. Es una pena que no nos veamos con más asiduidad, todos aprenderíamos a ser un poco más tolerantes. Ya no me quedan más disculpas, finalmente habrá que hacer la tortilla. Gracias.

*Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.*

Campos de Castilla
Antonio Machado

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Sensibilidad nociceptiva en la cavidad oral	3
1.1.1. Fibras nerviosas periféricas	7
1.1.2. Receptores	10
1.1.3. Neuronas de primer orden (Ganglio de Gasser)	14
1.2. Complejo nuclear sensitivo del trigémino.....	21
1.2.1. Núcleo sensitivo principal	23
1.2.2. Núcleo oral	24
1.2.3. Núcleo interpolar	25
1.2.4. Núcleo caudal	26
1.3. Sensibilidad nociceptiva en el complejo nuclear sensitivo del trigémino	29
1.3.1. Núcleo caudal	29
1.3.2. Núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino	36
a) Núcleo oral	39
b) Núcleo interpolar	45
c) Núcleo sensitivo principal	52
1.4. Médula espinal cervical.....	54
1.4.1. Organización del asta dorsal.....	55
a) Lámina I.....	56
b) Lámina II	60
c) Lámina III	62
d) Lámina IV.....	64
e) Lámina V	66

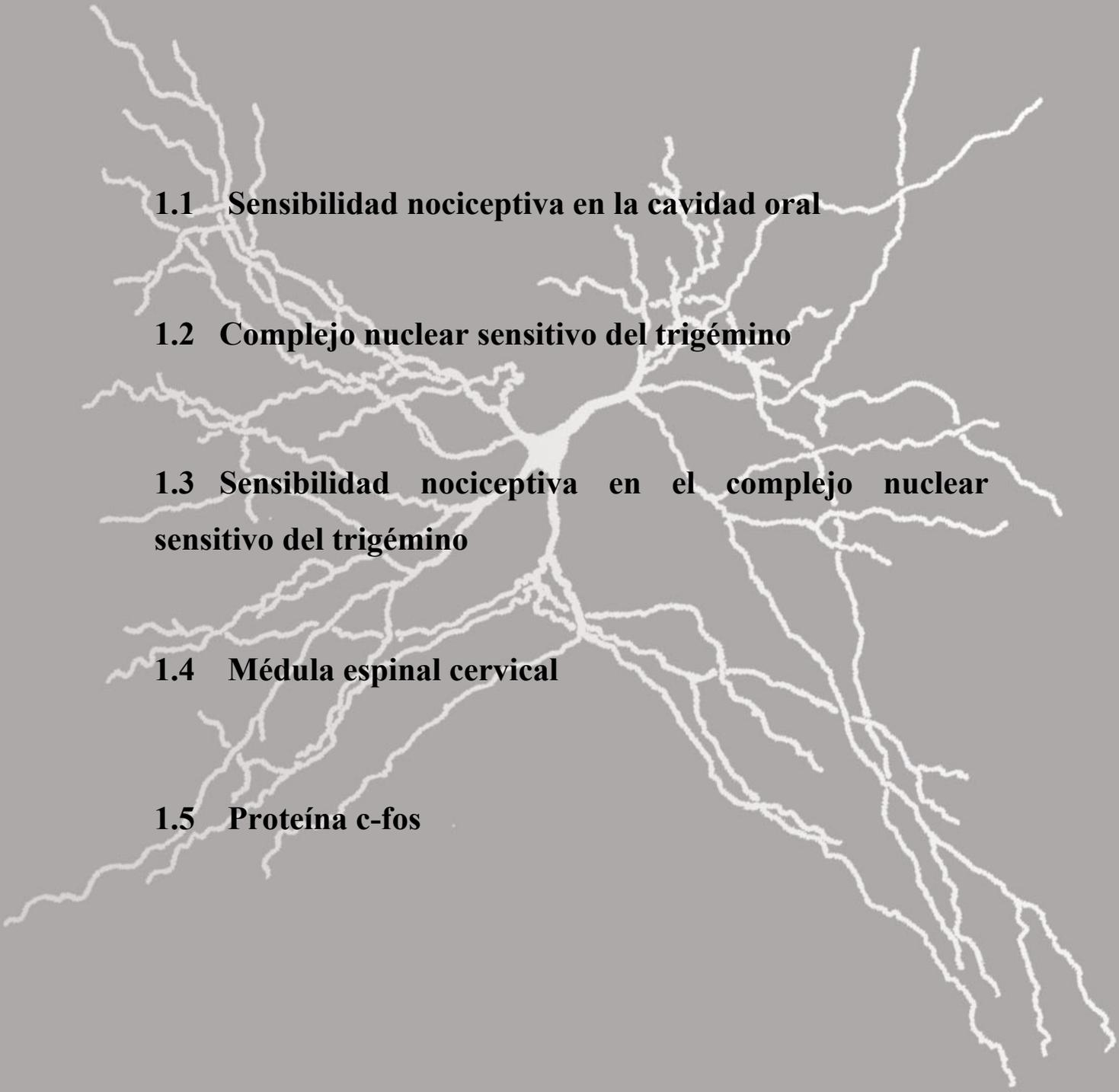
1.5. Proteína c-fos.....	69
2. Justificación y objetivos	77
3. Material y métodos	87
3.1. Animales de experimentación	89
3.2. Demostración inmunohistoquímica de sustancia P y CGRP	91
3.2.1. Método inmunohistoquímico.....	92
3.3. Demostración mediante transporte transganglionar de neurotrazadores enzimáticos de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas.....	95
3.3.1. Técnica operatoria	95
3.3.2. Perfusión. Fijación. Almacenamiento y sección de los bloques de tejido nervioso	96
a) Perfusión.....	97
b) Extracción del encéfalo y médula espinal: postfijación	98
c) Sección de los bloques de tejido nervioso.....	99
3.3.3. Demostración histoquímica de los neurotrazadores enzimáticos.....	99
3.4. Estimulación química nociceptiva	102
3.4.1. Sustancias químicas nocivas utilizadas	102
a) Capsaicina.....	102
b) Formalina.....	107
c) Aceite de mostaza.....	109
d) Fármacos GABAérgicos.....	112
3.4.2. Técnica operatoria	114
3.4.3. Perfusión. Fijación. Almacenamiento y sección de los bloques de tejido nervioso	115
a) Soluciones empleadas en la perfusión.....	118
b) Técnica de perfusión.....	119
c) Extracción del encéfalo y médula espinal: postfijación	120
d) Sección de los bloques de tejido nervioso.....	121
3.4.4. Demostración inmunohistoquímica de la proteína c-fos.....	122
3.5. Tinciones histológicas complementarias.....	123
3.6. Observación del material.....	124

4. Resultados	127
4.1. Inmunorreactividad de sustancia P y CGRP	129
4.1.1. CGRP	129
4.1.2. Sustancia P	131
4.2. Proyección central de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas	133
4.2.1. CTb-HRP	133
4.2.2. IB4-HRP	134
4.2.3. WGA-HRP	134
4.3. Localización de las neuronas que expresan c-fos	136
4.3.1. Controles	136
a) Solución salina	136
b) Aceite mineral	143
c) Anestesia	149
4.3.2. Aceite de mostaza	154
4.3.3. Formalina	162
4.3.4. Capsaicina	166
4.3.5. Aceite de mostaza conjuntamente con antagonistas del sistema GABA _B	171
4.3.6. Aceite de mostaza conjuntamente con agonistas del sistema GABA _B	179
4.4. Diferencias en la expresión de c-fos entre los distintos grupos experimentales	187
4.4.1. Ipsilateral	187
a) Núcleo oral del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo oral	187
▪ Diferencias con los grupos control	187
▪ Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos	188
▪ Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	189
b) Núcleo interpolar del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar	196
▪ Diferencias con los grupos control	196

▪	Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos.....	197
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	197
c)	Núcleo caudal del trigémino y primer segmento cervical	205
▪	Diferencias con los grupos control	205
▪	Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos.....	205
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	206
d)	Núcleos paratrigeminales	209
▪	Diferencias con los grupos control	209
▪	Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos.....	210
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	210
e)	Complejo parabraquial	218
▪	Diferencias con los grupos control	218
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	218
4.4.2.	Contralateral	220
a)	Núcleo oral del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo oral	220
▪	Diferencias con los grupos control	220
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	220
b)	Núcleo interpolar del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar	224
▪	Diferencias con los grupos control	224
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	224
c)	Núcleo caudal del trigémino y primer segmento cervical	228
▪	Diferencias con los grupos control	228
▪	Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	228
d)	Núcleos paratrigeminales	230
▪	Diferencias con los grupos control	230

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	230
e) Complejo parabraquial	235
▪ Diferencias con los grupos control	235
▪ Efectos de fármacos del sistema GABA _B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza	235
4.5. Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino de la rata	237
5. Discusión.....	239
5.1. Expresión de CGRP y sustancia P en el complejo nuclear sensitivo del trigémino	241
5.1.1. CGRP.....	241
5.1.2. Sustancia P.....	244
5.2. Distribución central de las aferentes primarias trigeminales visualizadas con neurotrazadores.....	247
5.2.1. CTb-HRP	247
5.2.2. IB4-HRP	249
5.2.3. WGA-HRP	250
5.3. Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y estructuras relacionadas	251
5.3.1. Núcleo caudal	251
5.3.2. Núcleo interpolar	258
5.3.3. Núcleos paratrigeminales	261
5.3.4. Núcleo oral	265
5.3.5. Núcleo principal	271
5.3.6. Complejo nuclear parabraquial.....	272
5.3.7. Formación reticular adyacente al complejo nuclear sensitivo.....	274
6. Conclusiones.....	277
7. Histogramas	281
8. Iconografía	299
9. Bibliografía.....	347

1. Introducción



1.1 Sensibilidad nociceptiva en la cavidad oral

1.2 Complejo nuclear sensitivo del trigémino

1.3 Sensibilidad nociceptiva en el complejo nuclear sensitivo del trigémino

1.4 Médula espinal cervical

1.5 Proteína c-fos

1.1. Sensibilidad nociceptiva en la cavidad oral

En todas las civilizaciones, en todos los países y en todos los momentos históricos, el dolor ha sido el principal enemigo del hombre. Éste se ha intentado combatir y desterrar recurriendo para ello desde las soluciones más simples, tales como la práctica de ritos (p. ej. los egipcios taponaban los orificios de la nariz y de los oídos a sus muertos para evitar que los genios del mal penetraran en su interior y así preservarlos para su reencarnación), hasta las técnicas más sofisticadas de las que se disponen actualmente.

Desde los inicios de la Humanidad, la inquietud por dar explicación a qué y por qué es el dolor ha sido manifiesta, aportándose teorías que, cuando menos, rondan lo absurdo y son fruto de la carencia de una base científica. Los Babilonios otorgaron al corazón el lugar donde se encontraban las sensaciones, considerando que el dolor era provocado por malos espíritus que encendían fuegos en el interior del organismo. Posteriormente, Alchaleón, el mayor representante médico de la escuela pitagórica, demostró mediante disecciones anatómicas que las sensaciones residían en el cerebro; siendo propuesto por Hipócrates que el dolor era una manifestación de la disarmonía de los cuatro elementos fundamentales (calor, frío, humedad y sequedad) y de los cuatro humores presentes en el cuerpo (moco, bilis negra, bilis amarilla y sangre). Sin embargo, el mayor influjo que recibió la posterioridad fue a través de Platón y de Aristóteles, para quienes el corazón volvió a ser el centro de las sensaciones, mientras que el cerebro lo era para los recuerdos y el raciocinio. Finalmente, fue Descartes quien demostró, de manera concluyente, que el dolor era transmitido a través de los nervios periféricos hacia la médula, y por ella conducido a un centro especial del cerebro. Sin embargo, cabe destacar que estos conceptos ya habían sido brillantemente constatados en disecciones anatómicas por los médicos de la escuela de Alejandría, encabezados por Herófilo y Erasistrato, quienes describieron los nervios motores y los nervios sensitivos, localizando el alma en el cerebelo.

El dolor es definido por la Asociación Internacional para el Estudio del dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular actual o potencial o descrito como tal” (Merkshey, 1979). Éste presenta tres dimensiones: la *dimensión sensoriodiscriminativa*, que proporciona información sobre la localización, intensidad, calidad y duración del estímulo nocivo que lo evoca; la

dimensión afectiva, que le confiere su tonalidad desagradable y angustiosa y; la *dimensión cognoscitiva*, que incluye datos de memoria, reconocimiento y comparación (Wall y Melzack, 1984). La conjunción de las tres dimensiones es la responsable de los mecanismos reflejos (p. ej. la contractura de la musculatura lumbar ante una hernia discal) y de los mecanismos conscientes (p. ej. el reposo ante la fatiga), mediante los cuales se manifiesta la sensibilidad nociceptiva.

Cuando se habla de dolor, hay que hacer algunas distinciones porque existen distintos tipos según cual sea el origen y el tiempo de evolución de los mismos.

Atendiendo al **origen**, por una parte, se encuentra el dolor *nocioceptivo*, aquel que tiene una causa que estimula las terminaciones nerviosas y las cuales llevan a los centros conscientes cerebrales, las sensaciones cuya percepción constituye lo que se entiende por dolor; y por otra, se halla el dolor *introceptivo*, *dolor íntimo* o *dolor moral*, como el que se origina ante la pérdida de un ser querido, el cual desencadena frecuentemente estados depresivos y cronificación de los sufrimientos. Igualmente, en relación con el origen, Bell (1989) reconoce cuatro categorías de dolor: dolor somático superficial, somático profundo, neurógeno y psicogénico. El *dolor somático superficial* y el *somático profundo* pertenecen a dolores resultantes de estímulos sobre áreas inervadas por componentes neurales normales. El dolor somático superficial emana de estructuras superficiales (piel y mucosas externas), y el somático profundo de estructuras corporales profundas y vísceras. El *dolor neurógeno* se produce como resultado de anormalidades en el sistema neural y, el *dolor psicogénico* como resultante de ciertas influencias y condiciones físicas.

Desde el punto de vista de la **evolución**, hay que diferenciar el dolor agudo del crónico (Pertes y Heir, 1991). El *dolor agudo* es un dolor de corta duración, casi siempre relacionado con una causa bien definida (una enfermedad o a un daño traumático), que presenta un curso característico el cual desaparece al tratar el área afectada. El cuadro agudo es un mecanismo de alerta y preservación del individuo que cumple una importante función defensiva, al advertirle acerca de la presencia de una anomalía. El dolor agudo frecuentemente puede asociarse con ansiedad. La sobrevenida del mismo produce un comportamiento reactivo que origina actos muy primitivos como son los gritos, los gemidos y los sollozos y, fenómenos vegetativos como la midriasis, la taquicardia o la opresión. Cuando el dolor agudo persiste tras el paso de un tiempo prudencial aparece el *dolor crónico*. El dolor crónico es el síntoma más amenazador y debilitante y el que más confunde al clínico a la hora de establecer

un diagnóstico. El dolor crónico tiende a “internalizarse”, acentuándose los sentimientos de soledad y mezclándolos con otras ideas, sentimientos y percepciones, que juntos elevan la ansiedad y amplifican la experiencia dolorosa. Mientras que las terapéuticas convencionales tales como los analgésicos, el reposo y la inmovilización suelen ser de gran utilidad para combatir el dolor álgido, frecuentemente son inefectivas en el crónico y a veces incluso están contraindicadas. De la misma manera, los calmantes, los hipnóticos y los sedantes que se emplean en las fases agudas dolorosas, en las crónicas disminuyen las funciones cognitivas, aumentan la inactividad y en conjunto favorecen la depresión, rasgo importantísimo del dolor crónico. Precisamente el fin del dios Hércules es un caso muy instructivo de cómo el dolor crónico le condujo al suicidio. La esposa de Hércules, Dejanira, en un ataque de celos le envió una túnica a su esposo para que festejara la victoria tras destruir la ciudad de Ecalia. Sin embargo, cuando se encendió la hoguera ritual, la túnica que Dejanira había impregnado con la sangre del centauro Neso, se pegó al cuerpo de Hércules quemándole vivo, y si intentaba retirársela, se arrancaba con ella pedazos de su propia piel, causándole tremendos dolores. Hércules, convencido de que su dolor no tenía remedio, pues nada lograba aliviarle, subió al monte Eta y haciendo una pira se suicidó (unas leyendas dicen que con la ayuda de su padre, mientras que otras comentan que fue Filoctetes).

En la extremidad cefálica, y concretamente en la región orofacial, se genera una amplia gama de sensaciones: exteroceptivas, propioceptivas, interoceptivas y sensoriales. Una de las sensaciones que más preocupa al clínico es la nocicepción, una sensación exteroceptiva que representa uno de los síntomas más frecuentes y uno de los motivos más comunes por los que los pacientes acuden a consulta.

El área orofacial, territorio inervado por las fibras sensitivas del V par craneal, el nervio trigémino, frecuentemente se ve comprometida por múltiples patologías, entre las que cabe destacar desde una simple odontalgia o dolores de origen mucoso, lingual o glandular, a padecimientos más complejos como son las neuralgias trigeminales; las algias vasculares, entre las que se incluyen las cefaleas en racimos y el síndrome de Tolosa-Hunt, entre otras y; la disfunción de la articulación temporomandibular.

Diariamente, el clínico se enfrenta al reto de paliar cuadros dolorosos, cuya compleja resolución muchas veces puede ser atribuible a que:

- a) El dolor es una experiencia individual y subjetiva, que sólo el paciente puede experimentar y describir su extensión, intensidad, duración y naturaleza.

- b) La reacción al dolor varía ostensiblemente de un sujeto a otro y depende de su estado emocional, como en el caso de las artralgias temporomandibulares, pudiendo en algunos casos las experiencias dolorosas previas condicionar la actitud ante el dolor actual.
- c) El dolor a menudo es difuso, irradiado y mal localizado. En este sentido cabe destacar el dolor cardíaco irradiado, el cual es una consecuencia de las interconexiones interneuronales entre las raíces cervicales superiores y los niveles medulares del nervio trigémino. En este cuadro, el dolor se localiza más frecuentemente en el ángulo mandibular, que está inervado por las raíces cervicales superiores C2 y C3 (Peñarrocha *et al.*, 1990).
- d) Existen lagunas en el conocimiento actual de diversas disciplinas de las ciencias básicas como la neuroanatomía, la neurofisiología, la neuroquímica y la neurofarmacología.

De todo lo comentado anteriormente se deduce que, el ahondamiento en el conocimiento de los mecanismos periféricos y centrales implicados en la producción y mantenimiento del dolor orofacial, contribuirá a esclarecer con la máxima certeza la causa que lo origina, pudiendo de esta forma establecer la terapéutica más adecuada que permita subsanarlo. En este sentido, Meller (1994), en un artículo que versa sobre los mecanismos del dolor afirmó: “en el tratamiento eficaz del dolor crónico y persistente, es crucial comprender mejor los mecanismos que subyacen en los distintos tipos de hiperalgesia”.

En la región orofacial, la vía de la sensibilidad dolorosa, al igual que las correspondientes a las de las otras sensaciones que se engloban dentro del denominado sistema somático aferente general (temperatura, presión y tacto), constan a nivel periférico, de un receptor y de una neurona de primer orden situada en el ganglio de Gasser. Estos elementos periféricos brindan la información sensoriodiscriminativa sobre calidad, intensidad, ubicación y duración de un estímulo aplicado en la boca o cara. Cuando un receptor es excitado por un estímulo, los impulsos aferentes son transmitidos hacia los centros nerviosos de segundo orden (fundamentalmente hacia el complejo nuclear sensitivo del trigémino) por las prolongaciones periférica y central de la primera neurona.

1.1.1. Fibras nerviosas periféricas

Las fibras nerviosas aferentes primarias que se hallan en los nervios periféricos son distintas morfológica y funcionalmente. Las fibras nerviosas existen de todos los tamaños comprendidos entre 0,5 y 20 μm de diámetro, siendo los límites extremos de la velocidad de conducción 0,5 y 120 m/seg. Esto contemplado desde un punto de vista práctico equivaldría a decir que, en las fibras largas que presentan la mayor velocidad de conducción (120 m/seg), los impulsos recorren una distancia mayor a la de un campo de fútbol en tan solo 1 segundo; mientras que las fibras de menor velocidad de conducción (0,5 m/seg), necesitan unos 2 segundos para pasar desde el dedo gordo del pie hasta la médula espinal.

Es bien sabido que existe una estrecha relación entre el diámetro de una fibra nerviosa periférica y su velocidad de propagación del impulso, en el sentido de que cuanto mayor es el diámetro, más rápidamente conduce los potenciales de acción. Sin embargo, hay que tener presente que para un mismo tipo de fibras, la velocidad de conducción es mayor en los vertebrados que en los animales inferiores. Hursh (1939) profundizó más en el tema y afirmó que, en las fibras mielínicas, la velocidad de propagación del impulso nervioso es aproximadamente 6 veces la del diámetro de la fibra.

Resulta evidente que algunos tipos de información deben transmitirse al sistema nervioso central muy rápidamente, ya que de lo contrario carecerían de utilidad. Un ejemplo de ello son las señales que informan al cerebro de las posiciones momentáneas de las piernas en cada fracción de segundo cuando se realiza un ejercicio atlético. En el otro extremo, algunas cualidades de la información sensorial, como las descritas para el dolor sordo y prolongado, no conllevan tal exigencia. En el primer caso, la información lógicamente, debe transmitirse por una fibra nerviosa de conducción rápida y, por lo tanto, gruesa; mientras que en el segundo, ésta puede transmitirse por una fibra de conducción lenta y, por consiguiente, delgada.

El tamaño de las fibras tiene gran importancia clínica para comprender la progresión del bloqueo de la conducción en un nervio por acción de un anestésico o por hipoxia. El bloqueo sigue un orden creciente, de modo que primero dejan de conducir las fibras de menor calibre y en último lugar las de mayor diámetro.

Las diferencias morfológicas y funcionales que presentan las fibras nerviosas aferentes primarias, condujeron a Erlanger y Gasser (1937) y a Lloyd (1943) a clasificarlas atendiendo a su diámetro, presencia de mielina, velocidad de conducción y tipo de sensibilidad que transmiten. Erlanger y Gasser (1937) dividieron las fibras nerviosas en tres grupos: fibras A, B y C.

Las **fibras A** son fibras mielinizadas, de un diámetro comprendido entre 2-20 μm y una velocidad de conducción del impulso nervioso entre 12-120 m/seg. Estos axones son las fibras habituales de los nervios espinales que unen los centros a los músculos esqueléticos y a los órganos de los sentidos. A su vez, las fibras A comprenden 4 subtipos, que de mayor a menor velocidad de conducción son: $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ y $A\delta$.

- Las **fibras $A\alpha$** presentan un grosor de 12 a 20 μm y conducen el impulso nervioso a una velocidad de 70-120 m/seg. Son responsables de transmitir impulsos propioceptivos, vibración e impulsos motores. En el sistema eferente, constituyen los axones que salen de las motoneuronas para inervar las fibras musculares extrafusales del músculo estriado esquelético. En el sistema aferente, son las fibras que inervan los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi, también localizados en el músculo esquelético (Brodal, 1981; Brown, 1981). En la clasificación de Lloyd (1943) las fibras $A\alpha$ del sistema aferente equivalen al **Grupo I**, dentro del cual se distinguen atendiendo a su destino, dos subgrupos: fibras Ia y fibras Ib. Las **fibras Ia** empiezan en la periferia, en las terminaciones anuloespirales de los husos neuromusculares. A pesar de presentar un diámetro medio de aproximadamente 17 μm , diversos estudios electrofisiológicos realizados en el gato (Matthews, 1963; Brown, 1981) indican que las fibras Ia pueden conducir el impulso a una velocidad igual o superior a 80 m/seg, lo que significa que el límite de 70 m/seg no constituye una separación nítida entre las fibras $A\alpha$ y las demás. Las **fibras Ib** inervan los órganos tendinosos de Golgi y son tan abundantes como los anteriores. Presentan un diámetro medio de 16 μm , por lo que tienen una velocidad de conducción algo más lenta que las fibras Ia.
- Las **fibras $A\beta$** miden 5-12 μm de diámetro y conducen el impulso nervioso a una velocidad de 30-70 m/seg. En el sistema eferente, constituyen las colaterales de las fibras $A\alpha$ que van a inervar las fibras musculares intrafusales. En el sistema aferente, se corresponden con el **Grupo II** de la clasificación de Lloyd (1943), las

cuales forman las terminaciones secundarias (terminaciones en flor o en ramillete) de los husos neuromusculares y transmiten los impulsos que determinan los reflejos flexores. Otras fibras que conducen en el rango A β se relacionan con los receptores táctiles de la piel más diferenciados, transmitiendo sensaciones tales como el tacto, la presión o la vibración.

- Las **fibras A γ** tienen un diámetro de 3-6 μm y una velocidad de propagación del impulso nervioso de 15-30 m/seg. En el sistema eferente, son los axones que inervan las fibras musculares intrafusales y que nacen de las motoneuronas γ . En el sistema aferente, a pesar de que se les ha relacionado con fibras que conducen el tacto (Brown, 1981), Shorland *et al.* (1989) investigando la velocidad de transporte de las fibras mecanorreceptoras, consideraron que todas eran del tipo A β .
- Las **fibras A δ** miden 2-5 μm de diámetro y conducen el impulso nervioso a una velocidad de 12-30 m/seg. Son las fibras mielínicas que presentan el menor grosor y todas ellas pertenecen al sistema aferente, incluyéndose en el **Grupo III** de la clasificación de Lloyd (1943). Estas fibras principalmente transmiten el dolor rápido y punzante (Brodal, 1981), aunque también se les ha relacionado con la recepción de cambios de temperatura (Darian-Smith y Johnson, 1977; Brown, 1981).

Las **fibras B** son, al igual que las precedentes, fibras mielinizadas pero que presentan un diámetro menor (generalmente inferior a 3 μm) y una velocidad de conducción más lenta (3-15 m/seg) que aquellas. Comprende las fibras preganglionares simpáticas o fibras eferentes mielínicas del sistema autónomo (Brodal, 1981).

Las **fibras C** son los axones de menor diámetro (0,5-2 μm), carecen de mielina y conducen los impulsos nerviosos a escasa velocidad (0,5-2,3 m/seg). Su pequeño grosor ha sido causa de que su abundancia haya pasado inadvertida durante muchos años, y en consecuencia, haya dificultado el conocimiento de su función. Constituyen tanto fibras sensoriales del sistema somático aferente general, donde se corresponden con el **Grupo IV** de la clasificación de Lloyd (1943), como fibras autónomas postganglionares. En las raíces posteriores, su número es 3 ó 4 veces mayor que el de fibras mielínicas. En los nervios cutáneos aproximadamente hay el mismo número de unas que de otras, y en el nervio neumogástrico constituyen el 75% del total en el segmento cervical y, el 90% en el segmento abdominal del nervio. En el sistema somático aferente general, las fibras

amielónicas son las que forman parte de las terminaciones libres en la piel alcanzando la epidermis. A pesar de que durante mucho tiempo se asignó a las fibras C la única función de transmitir impulsos nociceptivos, especialmente de tipo lento (Brodal, 1981), actualmente también se piensa, dado el número tan alto de estas fibras que hay en los nervios cutáneos, que transmiten otras formas de sensibilidad como la temperatura, el picor y el tacto grosero.

Generalmente, se ha visto que el tamaño del cuerpo neuronal de las células que originan fibras $A\alpha$ - $A\gamma$, presenta una correlación positiva con el diámetro de los axones; es decir, cuanto mayor es el diámetro mayor soma neuronal presentan, y viceversa (Harper y Lawson, 1985; Cameron *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1986; Mense, 1990). Esto significa que las neuronas de mayor tamaño conducen más velozmente el impulso nervioso (Lee *et al.*, 1986). Por el contrario, esta relación entre el tamaño del soma y la velocidad de propagación del impulso nervioso, no se observa en las neuronas ganglionares que originan fibras nociceptivas, es decir, fibras $A\delta$ y C (Lee *et al.*, 1986; Hoheisel y Mense, 1987; Mense, 1990), aunque suelen ser de pequeño tamaño.

1.1.2. Receptores

Las ramas periféricas de los axones de las neuronas de primer orden que se sitúan en el ganglio trigeminal, una vez alcanzan la superficie externa del organismo forman estructuras especiales denominadas receptores exteroceptivos, los cuales se encargan de percibir estímulos del medio ambiente. Desde un punto de vista fisiológico, los receptores cutáneos del sistema exteroceptivo se clasifican en: mecanorreceptores, termorreceptores y nociceptores, siendo únicamente a estos últimos a los que nos referiremos por el tema que nos atañe.

Nociceptores

A partir de los estudios realizados por Perl y colaboradores realizados a finales de la década de los 60 del siglo pasado (Burgess y Perl, 1967; Perl, 1968; Bessou y Perl, 1969), se sabe que existen nociceptores cutáneos específicos en numerosas especies animales, aunque similares tipos de receptores también se han identificado en otras áreas tales como las mucosas externas y las articulaciones (Brodal, 1981).

Los nociceptores pueden clasificarse atendiendo a la velocidad de conducción de sus axones periféricos así como, en función de su respuesta a diferentes formas de estimulación. El nombre de los diversos tipos de receptores del dolor se deriva de estos dos rasgos. Generalmente, los nociceptores se relacionan con las fibras mielinizadas (fibras A δ) y con las no mielinizadas (fibras C) de diámetro pequeño. Teniendo en cuenta el tipo de estímulo, algunos nociceptores responden sólo a estímulos mecánicos; otros a estimulación mecánica, térmica y química; mientras que otros sólo lo hacen a estímulos térmicos y mecánicos.

Nociceptores mecánicos

Los nociceptores mecánicos, también conocidos como mecanorreceptores de alto umbral, mecanorreceptores de presión moderada o mecanorreceptores de baja sensibilidad, responden sólo a estímulos mecánicos moderadamente intensos o nocivos. Sin embargo, se ha visto que algunos también son activados por estimulación térmica tras una exposición repetida al calor, razón por la cual Campbell *et al.* (1979) se refieren a éstos como receptores mecanotérmicos.

Los nociceptores mecánicos mielinizados fueron descritos por primera vez con detalle en el tegumento de las extremidades del gato (Burgess y Perl, 1967) y mono (Perl, 1968), siendo posteriormente también demostradas en la piel facial del mono y gato (Dubner y Hu, 1977; Hu y Sessle, 1980), en las extremidades del conejo (Fitzgerald y Lynn, 1977) y en el antebrazo del hombre (Adriaensen *et al.*, 1981).

Los nociceptores mecánicos mielinizados generalmente tienen velocidades de conducción en el rango de las fibras A δ . Sin embargo, en algunos artículos (Burgess y Perl, 1973; Campbell *et al.*, 1979) se habla de nociceptores mecánicos con velocidades de conducción en el rango de las fibras A β , localizados en la región cutánea de las extremidades del gato y mono.

Los nociceptores mecánicos mielinizados, aunque rara vez son activados por un estímulo térmico inicial en el rango de 45-55°C, con frecuencia responden al calor tras una estimulación repetitiva (Burgess y Perl, 1973). Resulta de gran interés, sin embargo, que a pesar de esta sensibilización al calor, estos nociceptores no presentan una alteración en la respuesta a la estimulación mecánica (Fitzgerald y Lynn, 1977; Campbell *et al.*, 1979).

Mucho menos se sabe acerca de nociceptores mecánicos amielínicos. Este tipo de nociceptor parece ser que inerva las extremidades del gato y mono (Bessou y Perl, 1969; Georgopoulos, 1976), sin embargo en este último sólo representa un 10-15% de la población de fibras C. Se ha visto que algunas de estas neuronas en el gato pueden responder a estímulos fríos nocivos, por lo que deberían ser clasificados como nociceptores mecanotermicos (Price y Dubner, 1977).

Nociceptores polimodales

Los nociceptores polimodales responden a estímulos mecánicos y térmicos nocivos, al mismo tiempo que muchos de ellos también pueden ser excitados por irritantes químicos. Los nociceptores polimodales se han identificado en la piel de numerosas especies animales y representan una importante proporción de la población de fibras C. Concretamente en el mono se ha visto que el 80-85% de las fibras C son nociceptores, predominantemente del tipo polimodal.

Estos receptores fueron descritos por primera vez con detalle en el gato (Bessou y Perl, 1969), pero posteriores estudios también los han identificado en las extremidades del mono (LaMotte y Campbell, 1978), en la cara del mono y gato (Beitel y Dubner, 1976; Hu y Sessle, 1980), en las extremidades del conejo (Fitzgerald, 1979) y en el humano (Torebjörk y Hallin, 1974). Igualmente también existe una importante población en el músculo esquelético del perro (Kumazawa y Mizumura, 1977) y en la piel escrotal (Kumazawa y Mizumura, 1980), aunque en esta última la mayoría de los nociceptores polimodales son fibras A δ .

La sensibilidad de los nociceptores polimodales a los estímulos térmicos ha sido examinada cuantitativamente en numerosos estudios. Estas fibras tienen umbrales que varían de 38 a 49°C, aunque siempre presentan una sensibilidad máxima en el rango de 45 a 51°C (LaMotte y Campbell, 1978).

Los nociceptores polimodales fibras C son sensibilizados cuando se aplica una estimulación térmica repetitiva (Bessou y Perl, 1969; Fitzgerald, 1979), y de manera similar a lo comentado con relación a los nociceptores mecánicos A δ , la exposición al calor no sensibiliza los nociceptores polimodales a posteriores estímulos mecánicos nocivos (Bessou y Perl, 1969). Sin embargo, se ha visto que la sensibilización secundaria a una estimulación repetitiva por calor de los nociceptores polimodales sólo es una posible consecuencia. Cuando un estímulo es aplicado repetidamente en la misma localización, también se puede observar el fenómeno de fatiga o de supresión

temporal (Bessou y Perl, 1969; LaMotte y Campbell, 1978). La extensión de la fatiga depende de la intensidad y de la frecuencia del estímulo repetitivo, y parece ser característica de las poblaciones de fibras de conducción lenta (Price *et al.*, 1977). Un tercer efecto de la estimulación por calor repetitivo es la inactivación parcial o la depresión. La estimulación por calor nocivo intenso puede dañar la piel o el receptor, produciendo una reducción en la respuesta que puede durar horas. La sensibilización puede ser seguida de depresión si el calentamiento repetido es excesivo (Beitel y Dubner, 1976; Fitzgerald y Lynn, 1977). Un calentamiento intenso inicial también puede producir depresión sin que se observe ninguna sensibilización. Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, se comprueba que las consecuencias del calentamiento repetitivo de los nociceptores polimodales pueden ser muy variables.

Nociceptores mecanotermicos mielinizados

Los nociceptores mecanotermicos mielinizados, también denominados nociceptores térmicos o nociceptores del calor, son receptores que responden a estímulos mecánicos y térmicos en ausencia de sensibilización.

A pesar de que este tipo de nociceptores ha sido descrito en el mono (Burgess y Perl, 1973; Georgopoulos, 1976) y en humanos (Adriaensen *et al.*, 1981), durante mucho tiempo ha existido una gran controversia acerca de la existencia de los mismos, debido a la posibilidad de confusión con los nociceptores mecánicos mielinizados sensibilizados. Sin embargo, el hecho de que la latencia del primer dolor, que algunas veces se observa tras la aplicación de calor nocivo en humanos, sea demasiado corta como para ser justificado por la actividad de fibras C, o demasiado larga como para que el impulso sea transmitido por nociceptores mecánicos mielinizados incluso tras la sensibilización (Price *et al.*, 1977; Campbell *et al.*, 1979), constituía un indicio que abogaba a favor de la existencia de los mismos.

Actualmente se sabe que, los nociceptores mecanotermicos mielinizados se diferencian de los nociceptores mecánicos por presentar un menor umbral al calor, una mayor sensibilidad al calor nocivo y una latencia de respuesta más corta que estos últimos (Dubner *et al.*, 1977; Adriaensen *et al.*, 1981).

1.1.3. Neuronas de primer orden (Ganglio de Gasser)

El ganglio trigeminal o ganglio de Gasser presenta una forma semilunar y se localiza en la fosa de igual nombre, situada en la porción interna de la cara cerebral del peñasco del temporal.

Las neuronas trigeminales tienen forma esférica u ovoidea, poseen bastante citoplasma y un núcleo claro y redondeado. Estas neuronas, y en general las localizadas en cualquier ganglio periférico del sistema somático aferente general, presentan un soma muy variable, lo que ha conducido a Sommer *et al.* (1985) en la rata y a Andres (1961) y Lieberman (1976) en otros mamíferos, a clasificarlas al menos en tres tipos en función a su tamaño: grandes o medianas de citoplasma claro (tipo A), medianas o pequeñas de citoplasma oscuro (tipo B) y las más pequeñas (tipo C).

Las neuronas gasserianas, al igual que las de los ganglios raquídeos, son células monopolares, cuyo único axón se divide en dos prolongaciones: una periférica y otra central, no sin antes seguir un trayecto tortuoso o irregular constituyendo los denominados glomérulos de Cajal (Cajal, 1909). Una idea ampliamente difundida es que las prolongaciones periférica y central de las células ganglionares que presentan fibras mielinizadas, son de igual calibre; mientras que en las neuronas que poseen fibras amielínicas, la prolongación central es más fina que la periférica (Gasser, 1955; Lieberman, 1976). Sin embargo, investigaciones posteriores demuestran lo contrario en relación con las neuronas que presentan fibras mielínicas, tanto del ganglio de la raíz dorsal (Suh *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1986; Hoheisel y Mense, 1987) como del ganglio trigeminal (Terashima y Liang, 1991).

La **prolongación periférica** de las neuronas trigeminales de primer orden emana del borde convexo del ganglio, alcanzando el área orofacial tras organizarse en tres ramas: rama oftálmica de Willis, rama maxilar y rama mandibular; las dos primeras exclusivamente sensitivas y la última de carácter mixto. Los somas de origen de las ramas oftálmica y maxilar se sitúan en la parte frontal del ganglio de Gasser, mientras que los correspondientes al componente sensitivo de la rama mandibular se localizan en el área occipital del ganglio. La *rama oftálmica* inerva el tegumento de la frente, el párpado superior, la piel del dorso de la nariz, la mucosa de la porción anterosuperior del septo nasal, la mucosa de la porción anterior de los cornetes medio e inferior, los senos frontal y esfenoidal, las celdillas etmoidales posteriores, el globo ocular, las vías

lacrimales y el contenido de la fosa orbitaria. La *rama maxilar* se distribuye por la piel del pómulo, la porción anterior de la fosa temporal, el párpado inferior, las alas de la nariz, el labio superior, la mucosa de la región posterior de los cornetes y suelo de las fosas nasales, la mucosa del septo nasal, la mucosa de los senos esfenoidales, las celdillas etmoidales posteriores, el seno maxilar, la mucosa palatina y los dientes, el periodonto y la encía maxilares. El componente sensitivo de la *rama mandibular* inerva la región mentoniana, el labio inferior, las regiones geniana, maseterina, parotídea y temporal, el oído externo, la región gingivodentaria de la mandíbula, la mucosa vestibular, la mucosa del suelo de la boca y la mucosa de la lengua por delante de la V lingual.

El tamaño de los campos receptivos periféricos de las neuronas trigeminales varía de acuerdo con su localización proximodistal en la región facial, de tal forma que, las neuronas que proyectan a regiones anteriores o proximales de la cara (p. ej. nariz, labios) presentan campos receptivos pequeños, mientras que las que inervan áreas posteriores o distales (p. ej. cuero cabelludo y frente) poseen campos receptivos mayores, tendiendo a localizarse las neuronas en el primer caso, ventralmente y en el segundo caso, dorsalmente dentro del ganglio (Kerr y Lysak, 1964).

La **prolongación central** de las neuronas trigeminales de primer orden abandona el ganglio por su lado cóncavo, y pasa a formar parte de la raíz sensitiva o mayor del nervio trigémino, ocupando las fibras del nervio mandibular la posición más lateral y las del nervio oftálmico la más medial. Posteriormente, estas fibras penetran en el espesor del puente, donde adoptan una trayectoria ascendente o descendente, en este último caso conformando el tracto espinal o descendente (*tractus spinalis*) del nervio trigémino, para establecer sinapsis con neuronas de segundo orden. Estudios clínicos basados en secciones del tracto espinal trigeminal en casos de neuralgia grave (Smyth, 1939; Falconer, 1949), han confirmado que dicho tracto está organizado somatotópicamente de modo que, las fibras procedentes de la *rama oftálmica* son las más ventrales y descienden más caudalmente; las procedentes de la *rama mandibular* son las más dorsales y rostrales, y las de la *rama maxilar* ocupan una posición intermedia. Estos datos tienen gran interés médico ya que, permiten realizar tractotomías selectivas en casos de neuralgia del trigémino que no responden a otros tratamientos.

En el ganglio trigeminal, es posible establecer subclases neuronales atendiendo a su contenido en neuropéptidos, siendo los más importantes en relación con el estudio de

la nocicepción: el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P.

La primera evidencia que se tiene acerca de la presencia de **CGRP** en neuronas sensitivas primarias fue aportada por Rosenfeld *et al.* (1983), constatándose posteriormente en numerosos estudios su presencia tanto en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Ju *et al.*, 1987; Price y Flores, 2007) como del ganglio trigeminal (Fried *et al.*, 1989; Yasuhara *et al.*, 2007). Concretamente, se ha observado que el 50% y el 30% de las neuronas aferentes espinales (Ju *et al.*, 1987) y trigeminales (Fried *et al.*, 1989), respectivamente, son CGRP inmunorreactivas. Este neuropéptido se localiza preferentemente en neuronas de pequeño y mediano tamaño (Rosenfeld *et al.*, 1983; Kuwayama *et al.*, 1987; Fried *et al.*, 1989) provistas de axones de pequeño calibre (Silverman y Kruger, 1987), principalmente del tipo amielínico (Ichikawa *et al.*, 1995). En el estudio de Fried *et al.* (1989) se observó que el 55% de las neuronas trigeminales que inervaban la pulpa dental presentaban inmunorreactividad de CGRP, de las cuales sólo el 18% eran células grandes (35-50 μm de diámetro) y las restantes de mediano (20-35 μm de diámetro) a pequeño (10-20 μm de diámetro) tamaño.

En relación con la **sustancia P**, los primeros en demostrar su presencia en las células sensoriales de primer orden, y concretamente en los ganglios espinales fueron Hökfelt *et al.* (1975), corroborándose posteriormente su presencia también en células ganglionares trigeminales (Lehtosalo *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1985; Fried *et al.*, 1989; Shin *et al.*, 2003). Concretamente, Shin *et al.* (2003) observaron que alrededor de un 25% de las neuronas gasserianas eran sustancia P inmunorreactivas, frente a porcentajes menores (aproximadamente del 10%) registrados por Lehtosalo *et al.* (1984), Lee *et al.* (1985) y Fried *et al.* (1989). Al igual que fue comentado en relación con el CGRP, la sustancia P tiene predilección por las neuronas nociceptivas de pequeño y mediano tamaño (Kuwayama *et al.*, 1987; Fried *et al.*, 1989) con axones de pequeño calibre (Olgart *et al.*, 1977; Brodin *et al.*, 1981; Wakisaka *et al.*, 1985), razón que justifica la amplia colocalización de ambos neuropéptidos. Lee *et al.* (1985), Ju *et al.* (1987) y Shin *et al.* (2003) han observado que casi todas las neuronas del ganglio trigeminal así como del ganglio de la raíz dorsal que contienen sustancia P, también presentan CGRP.

Además de la coexistencia anteriormente comentada, tanto el CGRP como la sustancia P pueden colocalizarse con otras sustancias en neuronas sensitivas de primer orden. Con relación a la *sustancia P* se ha visto que coexiste con la sustancia K (Dalsgaard *et al.*, 1985; Hua *et al.*, 1985), una taquicinina codificada por el gen

precursor de la sustancia P; con la colecistoquinina (Kuwayama y Stone, 1986), un péptido de la familia de la colecistoquinina/gastrina; con la calretinina (Ichikawa *et al.*, 1993, 1995) y la calbindina (Shin *et al.*, 2003), dos proteínas fijadoras de calcio; con la galanina (Ju *et al.*, 1987; Shin *et al.*, 2003), un péptido responsable de la contracción de fibras musculares lisas; con la somatostatina (Ju *et al.*, 1987), el neuropéptido inhibidor de la liberación de somatotropina; con la dinorfina (Gibbins *et al.*, 1987), un péptido opiáceo y; con la acetilcolina (Hernández *et al.*, 2007), un neurotransmisor sintetizado a partir de la acetil coenzima A y la colina. Por el contrario, la sustancia P no suele coexpresarse con la fosfatasa ácida fluoruro resistente (FRAP) (Nagy y Hunt, 1982), un marcador selectivo de neuronas ganglionares de pequeño tamaño. En lo referente al CGRP, se ha visto que se colocaliza con la parvalbúmina (Ichikawa *et al.*, 1995), una proteína fijadora de calcio, lo cual es muy raro observarlo en el ganglio de la raíz dorsal (Ichikawa *et al.*, 1994); con la calbindina (Shin *et al.*, 2003); con la serotonina (Berman *et al.*, 2006), una monoamina neurotransmisora derivada del aminoácido triptófano; con la galanina (Ju *et al.*, 1987; Shin *et al.*, 2003); con la somatostatina (Ju *et al.*, 1987) y; con la dinorfina (Gibbins *et al.*, 1987).

Desde el descubrimiento del receptor VR1 (Caterina *et al.*, 1997) y el conocimiento de su localización preferente en neuronas de pequeño o mediano diámetro (neuronas de tipo B) (Sugimoto *et al.*, 1998c; Guo *et al.*, 1999) provistas de axones de baja velocidad de conducción (Jancsó y Lawson, 1990; Ikeda *et al.*, 1997), múltiples han sido los trabajos destinados a identificar este receptor en las células ganglionares sensitivas primarias (Ichikawa y Sugimoto, 2001, 2002; Stenholm *et al.*, 2002) por su utilidad como marcador de nociceptores. Igualmente se ha tratado de estudiar su relación con neuronas ganglionares peptidérgicas (sustancia P o CGRP), con las cuales se ha visto que presenta una escasa colocalización. Hou *et al.* (2002) observaron que aproximadamente el 10% y el 8% de las neuronas del ganglio trigeminal humano que presentan inmunorreactividad de CGRP y sustancia P, respectivamente, también expresaban el receptor VR1. De la misma forma, cuando se ha estudiado la coexistencia de estos neuropéptidos con el receptor VR1 únicamente en una subpoblación de neuronas atendiendo a su lugar de proyección, se ha observado que la coexpresión registrada igualmente no era muy elevada. En este sentido, Ichikawa *et al.* (2004) observaron que aproximadamente el 18% de las neuronas que inervaban la articulación temporomandibular presentaban inmunorreactividad de CGRP y expresaban el receptor VR1; de la misma forma que Dinh *et al.* (2003) detectaron que aproximadamente sólo el

5% de las neuronas trigeminales que proyectaban a la mucosa nasal presentaban inmunorreactividad de sustancia P y expresaban el receptor VR1. Esta parcial coexistencia justifica que algunas poblaciones neuronales peptidérgicas (CGRP y/o sustancia P) sean sensibles al tratamiento neonatal con capsaicina (Skofitsch *et al.*, 1985; Mori *et al.*, 1990; Marfurt *et al.*, 1993), una sustancia neurotóxica que activa el receptor VR1. En este sentido, Mori *et al.* (1990) observaron una desaparición prácticamente total de las fibras trigeminales CGRP y sustancia P que inervaban la mucosa oral tras la administración de capsaicina neonatal.

Junto con el estudio de la inmunorreactividad de CGRP y/o sustancia P destinada a definir poblaciones de nociceptores peptidérgicos, se halla la investigación basada en la unión de la isolectina B4 (IB4). Clásicamente se ha dicho que la IB4 es un marcador de nociceptores no peptidérgicos de pequeño tamaño, principalmente de tipo amielínico (Silverman y Kruger, 1988; Ambalavanar y Morris, 1993; Kobayashi y Matsumura, 1996), que normalmente coexiste con FRAP (Silverman y Kruger, 1988) y el cual está presente en neuronas sensitivas de primer orden (Fried *et al.*, 1989; Kobayashi y Matsumura, 1996; Eriksson *et al.*, 1998). Concretamente, en el estudio de Fried *et al.* (1989) se ha observado que el 40-50% de las neuronas gasserianas son marcadas por la IB4. Sin embargo, en contraposición a la idea clásica, una reciente investigación ha puesto en entredicho la utilidad de la IB4 para discernir entre nociceptores no peptidérgicos y peptidérgicos. Esta contradicción se basa en el importante solapamiento que existe entre neuronas con inmunorreactividad de CGRP o sustancia P y las neuronas que son marcadas con la IB4. En el ganglio de la raíz dorsal y en el ganglio trigeminal se ha visto que el 44,5% y el 27,5%, respectivamente, de las neuronas inmunorreactivas para CGRP también expresaban lugares de unión para IB4 (Price y Flores, 2007).

Por otro lado, y en sentido contrario al CGRP, a la sustancia P, al receptor VR1 y a la isolectina B4, se encuentran los marcadores de células grandes claras o células de tipo A, tales como la anhidrasa carbónica (Sugimoto *et al.*, 1990; Sugimoto y Takemura, 1993), el gangliósido GM1 (Fried *et al.*, 1989) y el anticuerpo monoclonal contra la proteína neurofilamento RT97 (Lawson *et al.*, 1984). En este sentido, destaca la investigación de Robertson y Grant (1989), quienes han definido una población de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de mediano y gran tamaño, las cuales normalmente son FRAP negativas y carecen de neuropéptidos, pero que presentan inmunorreactividad para gangliósido GM1, RT97 y anhidrasa carbónica.

En los ganglios sensitivos, la **anhidrasa carbónica** principalmente se encuentra en neuronas de mediano o gran tamaño que inervan los músculos (Sommer *et al.*, 1985; Peyronnard *et al.*, 1988) y presentan axones mielinizados de gran calibre (Sugimoto *et al.*, 1990). La actividad anhidrasa carbónica ha sido vista en aproximadamente el 50% de las neuronas trigeminales (Aldskogius *et al.*, 1988; Fried *et al.*, 1989) y en el 30% de las células gasserianas que presentan una proyección pulpar (Sugimoto *et al.*, 1990; Sugimoto y Takemura, 1993). La anhidrasa carbónica se colocaliza ampliamente con la parvalbúmina, un marcador de mecanorreceptores y/o propioceptores de gran tamaño. En el estudio de Ichikawa *et al.* (1994) se observó que el 90% de las neuronas trigeminales que contenían parvalbúmina también presentaban actividad anhidrasa carbónica.

La inmunorreactividad para **gangliósido GM1** y **RT97** se ha registrado en el 45% y 45%-50%, respectivamente, de las neuronas gasserianas; y en el 70% y 83%, respectivamente, de las neuronas trigeminales que presentaban una proyección pulpar (Fried *et al.*, 1989).

Sorprendentemente, a partir de lo comentado en los dos párrafos precedentes se vislumbra que la pulpa es inervada por un número considerable de neuronas con somas grandes, a pesar de que casi todos los axones intrapulpares son del rango de las fibras C y A δ (Fried y Hildebrand, 1981). Otros hallazgos que constatan la elevada proyección de neuronas de gran tamaño al tejido pulpar vienen reflejados por: a) el considerable número de nervios mielinizados que inervan la pulpa y presentan el receptor VRL1, el cual se sitúa principalmente en neuronas con soma de tamaño mediano o grande (Ichikawa y Sugimoto, 2000); b) la escasez de fibras pulpares que expresan el receptor VR1 (Ichikawa y Sugimoto, 2001), lo que justifica el insignificante efecto que tiene la capsaicina neonatal en neuronas pulpares (Holje *et al.*, 1983; Fried *et al.*, 1988); c) los estudios anatómicos con trazadores, que ponen de manifiesto que la mayoría de los somas que inervan la pulpa son de mediano o gran tamaño (Arvidsson y Gobel, 1981; Marfurt y Turner, 1984); d) las investigaciones electrofisiológicas que indican que muchas de las fibras nerviosas intrapulpares son las ramas de terminación de axones de mayor calibre (Lisney, 1978; Dostrovsky, 1981).

En tanto que los nervios pulpares han sido considerados transmitir principalmente o exclusivamente impulsos dolorosos (Dubner y Bennett, 1983), estos hallazgos entran en conflicto con el dogma de que la información nociceptiva es conducida por axones de pequeño tamaño, fibras C amielínicas y fibras A δ mielinizadas

(Fields y Basbaum, 1978; Craig, 2003). Una posible explicación para esta contradicción podría ser que, aunque el tamaño somal está relacionado con el diámetro de las fibras (Harper y Lawson 1985; Cameron *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1986; Mense, 1990), el tronco de los axones de las neuronas pulpares son más gruesos que sus segmentos terminales intrapulpares, lo cual vendría avalado por el elevado grado de ramificación terminal que presentan las neuronas pulpares (Fried y Hildebrand, 1981).

1.2. Complejo nuclear sensitivo del trigémino

El complejo nuclear sensitivo del trigémino es una columna de sustancia gris que se extiende a lo largo de los dos tercios inferiores del puente y de toda la altura del bulbo, situándose medialmente al tracto espinal o descendente del nervio trigémino. Caudalmente, se continúa con la cabeza del asta dorsal de la médula espinal cervical. Dentro del neuroeje presenta una oblicuidad de arriba a abajo y de dentro a afuera, de tal forma que su extremidad caudal produce sobre la superficie posterolateral del bulbo un relieve conocido con el nombre de tubérculo ceniciento de Rolando. El complejo nuclear sensitivo del trigémino constituye la principal zona de terminación de las fibras aferentes primarias trigeminales, las cuales conducen la información somatosensorial de la región orofacial, es decir, aquella de naturaleza táctil, térmica o dolorosa (Kappers *et al.*, 1936; Anthony, 1972; Kuhlenbeck, 1975; Brodal, 1981). En los mamíferos, esta información es transmitida mediante proyecciones ascendentes con origen en dicho complejo a tres lugares principales del sistema nervioso central: el tálamo, principalmente el complejo ventrobasal (Carpenter y Hanna, 1961; Smith, 1973; Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Woolston *et al.*, 1982), el mesencéfalo (Baleydier y Mauguier, 1978; Nagata y Kruger, 1979; Huerta *et al.*, 1981) y/o el cerebelo (Darian-Smith *et al.*, 1968; Steindler, 1977; Watson y Switzer, 1978; Ikeda, 1979; Woolston *et al.*, 1982). Al margen del complejo nuclear sensitivo del trigémino, las aferentes primarias trigeminales también se arborizan en otras regiones tales como, los núcleos reticulares lateral y parvocelular (Kruger y Michel, 1962a,b), el cerebelo (Jacquin *et al.*, 1982, 1983; Marfurt y Rajchert, 1991), el núcleo del fascículo solitario (Torvik, 1956; Contreras *et al.*, 1982; Jacquin *et al.*, 1982; Nomura *et al.*, 1984; Takemura *et al.*, 1987, 1991, 2000a; Segade *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997a), el núcleo supratrigeminal (Jacquin *et al.*, 1982, 1983; Takemura *et al.*, 1987; Marfurt y Rajchert, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997b), el núcleo paratrigeminal (Jacquin *et al.*, 1983; Takemura *et al.*, 1987; Marfurt y Rajchert, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997a,b, 1998a), los núcleos vestibulares (Azerad *et al.*, 1982; Marfurt y Rajchert, 1991; Takemura *et al.*, 2000a), el complejo parabraquial (Panneton, 1991; Takemura *et al.*, 2000a; Segade, 2003), el *locus caeruleus* (Takemura *et al.*, 2000a) y el núcleo motor del trigémino (Azerad *et al.*, 1982). Por otra parte, el complejo nuclear sensitivo del trigémino también recibe la proyección de fibras de origen no trigeminal,

como son aferentes faciales (Kerr, 1962; Nomura y Mizuno, 1983a; Young y Perryman, 1984), glossofaríngeas (Kerr, 1962; Nomura y Mizuno, 1981; Young y Perryman, 1984; Mizuno y Nomura, 1986; Lucier y Egizii, 1989), neumogástricas (Kerr, 1962; Nomura y Mizuno, 1983b, 1984; Young y Perryman, 1984), hipoglosas (Lucier y Egizii, 1989) y cervicales (Kerr, 1961, 1972; Young y Perryman, 1984; Tashiro *et al.*, 1991; Stover *et al.*, 1992).

En el momento del nacimiento, el complejo nuclear sensitivo del trigémino de mamíferos, tales como el gato (McHaffie *et al.*, 1986), la rata (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992) y el hombre (Quartu *et al.*, 1992a), ya presenta un estado de desarrollo más avanzado que otros sistemas sensitivos. A esta temprana edad, no sólo es posible identificar en dicho complejo las características subdivisiones atendiendo a la morfología celular, sino también varias de sus proyecciones centrales. Este desarrollo precoz del complejo trigeminal posibilita a los recién nacidos el poder responder a estímulos táctiles periorales que contribuyen a funciones como la orientación y el amamantamiento (Larson y Stein, 1984), cuando los sistemas visuales y auditivos aún no están correctamente desarrollados (Villablanca y Olmstead, 1979).

En los mamíferos, el complejo nuclear sensitivo del trigémino puede ser subdividido, desde un punto de vista estructural y funcional, en dos porciones: una superior y protuberancial, que constituye el denominado núcleo sensitivo principal (*nucleus principalis o nucleus sensibilis*); y otra bulboespinal llamada núcleo descendente o espinal (*nucleus tractus spinalis nervi trigemini*) (Cajal, 1909; Kappers *et al.*, 1936; Woodburne, 1936). El núcleo principal del trigémino es, filogenéticamente hablando, de aparición más reciente que el núcleo espinal (Kappers *et al.*, 1936; Woodburne, 1936; Brodal, 1981). A partir de un estudio anatómico realizado por Olszewski en el gato (Olszewski, 1950), es sabido que el núcleo espinal del trigémino puede ser subdividido a su vez, atendiendo a su citoarquitectura, en tres agrupaciones neuronales: *nucleus oralis*, *nucleus interpolaris* y *nucleus caudalis*. El núcleo caudal del trigémino presenta una gran similitud, no sólo morfológica y funcional sino también en cuanto a conexiones, con el asta dorsal de la médula espinal, que es el componente integral de los mecanismos nociceptivos espinales. Este es el motivo por el cual en las publicaciones inglesas se emplea la terminología de asta dorsal medular (*medullary dorsal horn*) para referirse a la subdivisión más caudal del núcleo espinal del trigémino (p. ej. Gobel *et al.*, 1981b; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984). Tanto en animales adultos (Eisenman *et al.*, 1963) como en recién nacidos (McHaffie *et*

al., 1986), los límites precisos que determinan la transición entre algunas de las subdivisiones del complejo nuclear sensitivo del trigémino no siempre son fácilmente identificables. En este sentido cabe destacar el límite entre los núcleos oral e interpolar del trigémino (Bruce *et al.*, 1987). La compartimentación del núcleo espinal del trigémino propuesta por Olszewski ha sido universalmente aceptada, resultando de gran ayuda tanto para anatomistas como para neurofisiólogos. Sin embargo, su nomenclatura original ha sido modificada con el fin de permitir realizar comparaciones filogenéticas, denominándose a las tres partes del núcleo espinal del trigémino: *subnucleus oralis*, *subnucleus interpolaris* y *subnucleus caudalis* (Crosby y Yoss, 1954).

1.2.1. Núcleo sensitivo principal

El núcleo principal del trigémino constituye la porción más rostral del complejo nuclear sensitivo del trigémino. Esta agrupación neuronal se sitúa medialmente a la raíz sensitiva del nervio trigémino y lateralmente al núcleo motor del trigémino, del cual se halla separado por la formación reticular y por las raíces motoras del nervio trigémino (Steindler, 1985). En el gato (McHaffie *et al.*, 1986), en la rata (Torvik, 1956; Hayashi, 1980; Bruce *et al.*, 1987; Arvidsson y Rice, 1991), en el hurón (Boissonade *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 2005) y en roedores (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987), este núcleo se extiende desde el polo rostral del núcleo motor del trigémino hasta las raíces motoras del facial, donde se continúa con el núcleo espinal del trigémino. En la rata (Arvidsson y Rice, 1991), la extensión rostrocaudal del núcleo principal (1,8 mm) es similar a la de los núcleos oral (1,5 mm) e interpolar (2,2 mm); mientras que en el hurón (Boissonade *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 2005), el núcleo principal presenta una extensión rostrocaudal notablemente inferior (1,6 mm) a la de los núcleos oral e interpolar (3,7 mm) del trigémino.

El núcleo principal del gato y el de las distintas especies de roedores mencionados anteriormente presenta dos porciones: una dorsal y otra ventral (Taber, 1961; McHaffie *et al.*, 1986; Paxinos y Watson, 1986; Boissonade *et al.*, 1993). La porción ventral se extiende más caudalmente que la dorsal (Bruce *et al.*, 1987; Boissonade *et al.*, 1993), tal y como fue descrito por Torvik (1956). Esta diferencia de desarrollo conlleva que, en la región caudal, la porción ventral del núcleo principal se solape con el polo rostral del núcleo oral, concretamente con la parte dorsal del núcleo

oral del trigémino (McHaffie *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1987). Las porciones dorsal y ventral del núcleo principal presentan una citoarquitectura muy similar, estando ambas constituidas por neuronas redondeadas u ovaladas de mediano o pequeño tamaño (McHaffie *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1987; Boissonade *et al.*, 1993). Sin embargo, la porción dorsal se caracteriza por poseer un mayor grado de empaquetamiento neuronal que la ventral (McHaffie *et al.*, 1986). La proyección más importante del núcleo principal es la trigeminotalámica (Fukushima y Kerr, 1979; Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987). En el gato, dicha proyección sigue dos vías claramente diferenciadas: una de ellas ipsilateral, con origen en la porción dorsal; y otra contralateral, procedente de la porción ventral (Shigenaga *et al.*, 1983, 1986c). Este hecho contribuye a corroborar la validez de la subdivisión del núcleo principal en dos porciones.

1.2.2. Núcleo oral

El núcleo oral es la porción más rostral del núcleo espinal del trigémino, y el cual se continúa caudalmente con el núcleo interpolar. A nivel rostral, este núcleo se sitúa medialmente al núcleo principal y lateralmente al núcleo motor del trigémino, a las raíces motoras del facial y al núcleo reticular parvocelular medular; mientras que a nivel caudal, se localiza medialmente al tracto espinal del trigémino y lateralmente al núcleo facial y al núcleo reticular parvocelular medular (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987). El tracto espinal del trigémino adyacente al núcleo oral de gatos (Gobel y Purvis, 1972) y de hurones (Boissonade *et al.*, 1993) presenta pequeñas islas de neuropilos. El límite caudal del núcleo oral varía de unas especies a otras, así como dentro de la misma especie según el autor considerado. En este sentido cabe señalar que Stewart y King (1963) en el gato, y Steindler (1985) en el ratón, han situado el límite caudal del núcleo oral a la altura del polo rostral del núcleo hipogloso; mientras que Bruce *et al.* (1987) en tres especies de roedores diferentes (ratas, ratones y hamsters), lo han localizado en el borde caudal del núcleo facial; y Hayashi (1980) en la rata, lo ha ubicado en el tercio oral de la oliva inferior. La transición entre los núcleos principal y oral del trigémino tiene lugar de manera oblicua, discurriendo de rostral a caudal y de medial a lateral (Torvik, 1956). Este hecho justifica que el núcleo oral primero aparezca en la zona medial del complejo nuclear sensitivo del trigémino, en concreto dorsomedialmente al

núcleo principal en la rata (Fukushima y Kerr, 1979) y ventromedialmente al núcleo principal en el gato (Berman, 1968) y en el hurón (Boissonade *et al.*, 1993).

Desde los estudios de Åström (1953) y Torvik (1956) se empezó a hablar de la existencia de subdivisiones dentro del núcleo oral. Actualmente, atendiendo a criterios citoarquitectónicos, se acepta la existencia de dos subnúcleos: ventrolateral y dorsomedial, los cuales son reconocidos tanto en roedores (Åström, 1953; Torvik, 1956; Falls, 1984, 1988; Falls *et al.*, 1985; Falls y Alban, 1986b; Bruce *et al.*, 1987; Raboisson *et al.*, 1989) como en gatos (Taber, 1961; Shigenaga *et al.*, 1986b, 1989). Dentro del subnúcleo dorsomedial, Shigenaga *et al.* (1986b, 1989) diferencian una subdivisión rostradorsomedial, la cual a mediados del siglo pasado ya fuera identificada por Torvik (1956) y posteriormente denominada por Eisenman *et al.* (1963) como subdivisión γ del núcleo oral. Pese a que los subnúcleos ventrolateral y dorsomedial son los más ampliamente reconocidos, algunos autores parcelan aún más el núcleo oral, identificando en él un tercer subnúcleo: el subnúcleo marginal (Falls *et al.*, 1985; Falls y Alban, 1986b; Falls, 1988). La validez de la subdivisión del componente más rostral del núcleo espinal del trigémino en tres porciones viene avalada por diferencias en cuanto al lugar de proyección. Las neuronas de la subdivisión dorsomedial establecen sinapsis principalmente en el cerebelo (Somana *et al.*, 1980; Matsushita *et al.*, 1982; Steindler, 1985; Falls y Alban, 1986a; Falls *et al.*, 1985) y en el núcleo motor del trigémino (Mizuno *et al.*, 1983; Landgren *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1988c; Fort *et al.*, 1990; Olsson y Westberg, 1991; Yoshida *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995); las de la subdivisión ventrolateral fundamentalmente en el tálamo (Burton y Craig, 1979; Matsushita *et al.*, 1982; Shigenaga *et al.*, 1983; Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987) y en el colículo superior (Killackey y Erzurumlu, 1981; Steindler, 1985; McHaffie *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1987); y las de la subdivisión marginal principalmente en el tálamo (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987) y en el cerebelo (Somana *et al.*, 1980; Matsushita *et al.*, 1982; Steindler, 1985; Falls y Alban 1986a; Falls *et al.*, 1985).

1.2.3. Núcleo interpolar

El núcleo interpolar es la parte del núcleo espinal del trigémino situada entre los núcleos oral y caudal (Olszewski, 1950). Este núcleo se localiza en la concavidad ventrolateral del tracto descendente trigeminal (McHaffie *et al.*, 1986). En la parte

dorsal y en el tercio medio del borde lateral del tracto espinal del trigémino adyacente al núcleo interpolar de gatos (Gobel y Purvis, 1972), hurones (Boissonade *et al.*, 1993) y ratas (Chan-Palay, 1978a; Phelan y Falls, 1989b) existen islas de neuronas y neuropilos. El núcleo interpolar del gato (McHaffie *et al.*, 1986), de la rata (Hayashi, 1980; Bruce *et al.*, 1987; Arvidsson y Rice, 1991), del hurón (Boissonade *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 2005) y de otros roedores (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987) se extiende caudalmente hasta aproximadamente el nivel del óbex, la zona más rostral del área postrema. A esta altura, el núcleo interpolar disminuye de tamaño, de tal forma que sólo es posible identificarlo adyacente al tracto espinal trigeminal situado lateralmente, mientras que el polo rostral del núcleo caudal comienza a aparecer más medialmente (Jacquin *et al.*, 1988a; Phelan y Falls, 1989a). En el gato (Taber, 1961), la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar es igual que la del núcleo oral (3 mm). Al igual que el límite entre los dos núcleos más rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, la transición entre los núcleos oral e interpolar, tiene lugar de manera oblicua (Phelan y Falls, 1989a). A diferencia del núcleo caudal, el núcleo interpolar no es una estructura laminada (Phelan y Falls, 1989a). El núcleo interpolar presenta una apariencia citológica muy similar a la del núcleo oral (Kerr *et al.*, 1968), razón que ha conducido a Kruger y Michel (1962a) a dudar acerca de dicha subdivisión en base a criterios citoarquitectónicos. El núcleo interpolar consta de neuronas pequeñas y redondeadas densamente empaquetadas, las cuales se entremezclan con células de mediano tamaño y de morfología generalmente poligonal, hallándose numerosos fascículos de axones esparcidos por todo el núcleo (Olszewski, 1950; Taber, 1961; Fukushima y Kerr, 1979; McHaffie *et al.*, 1986; Boissonade *et al.*, 1993).

1.2.4. Núcleo caudal

El núcleo caudal, el cual ya es posible identificarlo en los ciclóstomos (Crosby y Yoss, 1954), es el grupo celular más primitivo del núcleo espinal trigeminal, siendo además el primero en diferenciarse durante el desarrollo de la porción bulboespinal trigeminal del feto (Brown, 1958). En gatos (Stewart y King, 1963; McHaffie *et al.*, 1986), monos (Kerr *et al.*, 1968), ratas (Hayashi, 1980; Bruce *et al.*, 1987; Arvidsson y Rice, 1991), hurones (Boissonade *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 2005) y otros roedores (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987), este núcleo se extiende desde

aproximadamente el nivel del óbex hasta el asta dorsal de la médula espinal, con la cual se continúa. La extensión rostrocaudal del núcleo caudal es de 6 mm en la rata (Paxinos y Watson, 1986), de 9 mm en el hurón (Boissonade *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 2005) y de 10 mm en el gato (Berman, 1968). La transición entre los núcleos interpolar y caudal se ha visto que difiere según la especie considerada. En este sentido cabe señalar que, mientras que el núcleo interpolar en la rata se localiza ventrolateralmente al núcleo caudal en la zona de transición (Paxinos y Watson, 1986; Jacquin *et al.*, 1988a), en el hurón se sitúa dorsolateralmente al núcleo caudal (Boissonade *et al.*, 1993). A partir de cortes transversales del bulbo teñidos con el método del Nissl, este núcleo fue inicialmente dividido por Olszewski (1950), en base a su citoarquitectura, en tres capas: marginal (*zonalis* o *marginalis*), gelatinosa (*gelatinosus*) y magnocelular (*magnocellularis*). Sin embargo, la gran similitud existente en cuanto a morfología, función y proyecciones entre este núcleo y el asta dorsal de la médula espinal (Gobel *et al.*, 1981b), ha llevado a considerar al núcleo caudal como el homólogo trigeminal del asta dorsal de la médula espinal (Gobel *et al.*, 1981b; Hu *et al.*, 1981). Esta razón ha conducido a diversos investigadores (p. ej. Gobel *et al.*, 1977, 1981b) a aplicar en el núcleo caudal del trigémino el esquema laminado originariamente descrito por Rexed en la médula espinal (Rexed, 1952); correspondiéndose la capa marginal con la lámina I, la capa gelatinosa con la lámina II y la capa magnocelular con las láminas III y IV de Rexed (Tiwari y King, 1974; Gobel *et al.*, 1977; Dubner y Bennett, 1983). Teniendo en cuenta, como se ha comentado previamente, que las características citoarquitectónicas de las láminas del núcleo caudal son análogas a las de la médula espinal, a continuación únicamente se hará un breve repaso de los aspectos más importantes, profundizándose más en el tema cuando se describa la organización laminar del asta dorsal de la médula espinal.

La **lámina I** es la lámina más delgada de todas, contiene neuronas alargadas o con forma de huso (McHaffie *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1987) y numerosos axones mielinizados de pequeño calibre, los cuales discurren mediolateralmente alrededor de la curvatura de dicha lámina (Gobel *et al.*, 1981b). Medialmente a la lámina I, se sitúa la **lámina II** que se corresponde con la sustancia gelatinosa de Rolando (Gobel *et al.*, 1981b), la cual fue descrita por primera vez por Rolando (1824) en la médula espinal. Esta lámina a su vez puede ser subdividida en dos láminas: una lámina externa (IIA o IIo) y otra interna (IIB o IIi) (Gobel, 1978b; Dubner y Bennett, 1983). Ambas láminas presentan neuronas ovals o redondeadas principalmente de pequeño tamaño (McHaffie

et al., 1986; Bruce *et al.*, 1987). La lámina IIo se diferencia de la lámina III por poseer un mayor número de axones mielinizados de pequeño diámetro orientados longitudinalmente, así como por la distribución menos laxa adoptada por las células presentes en este nivel (Gobel *et al.*, 1981b). La **lámina III** constituye la porción de la capa magnocelular adyacente a la sustancia gelatinosa (Tiwari y King, 1974) y contiene un mayor número de axones mielinizados que las láminas I, II y IV (Gobel *et al.*, 1981b). Presenta numerosas células de pequeño diámetro, las cuales tienden a formar agrupaciones neuronales (2-4 neuronas), así como muchos axones mielinizados de pequeño calibre (1-2micras de diámetro) que igualmente, con frecuencia, forman agregados en número de 10-20 axones (Gobel *et al.*, 1981b). La **lámina IV**, la porción más profunda de la capa magnocelular (Tiwari y King, 1974), contiene células grandes de forma multipolar o triangular, que tienden a concentrarse en la mitad ventral de la lámina (Boissonade *et al.*, 1993), y las cuales se hallan entremezcladas con numerosas neuronas de pequeño diámetro (McHaffie *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1987). Aunque las neuronas grandes también están presentes en la lámina III, en esta última lámina son menos numerosas (Olszewski, 1950; Gobel *et al.*, 1981b).

1.3. Sensibilidad nociceptiva en el complejo nuclear sensitivo del trigémino

Antiguamente se creía que las neuronas del complejo nuclear sensitivo del trigémino presentaban una organización rostrocaudal que guardaba relación con las distintas modalidades de información somatosensorial de la región orofacial; siendo las sensibilidades térmica y dolorosa codificadas en el núcleo caudal del trigémino, y la información táctil transmitida a centros nerviosos superiores a partir de divisiones más rostrales, fundamentalmente desde los núcleos principal y oral del trigémino (Spiller, 1915; Sjöqvist, 1938). Sin embargo, esta hipótesis actualmente ha sido desestimada, ya que tanto las neuronas trigeminales que responden a estímulos táctiles como a estímulos nociceptivos se encuentran en casi toda la extensión del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Gordon *et al.*, 1961; Wall y Taub, 1962; Eisenman *et al.*, 1963; Darian-Smith, 1966; Azerad *et al.*, 1982).

1.3.1. Núcleo caudal

Observaciones clínicas obtenidas a finales del siglo XIX y en la primera mitad del siglo XX (Hun, 1897; Sjöqvist, 1938; Weinberger y Grant, 1942; Hamby *et al.*, 1948), junto con registros electrofisiológicos (Gordon *et al.*, 1961; Nord, 1967, 1976; Mosso y Kruger, 1973; Nord y Ross, 1973; Beurman, 1975; Nord y Young, 1975; Yokota, 1975; Price *et al.*, 1976; Shigenaga *et al.*, 1976; Dostrovsky y Hellon, 1978; Dickenson *et al.*, 1981; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Bushnell *et al.*, 1984; Hu y Sessle, 1984; Amano *et al.*, 1986; Maixner *et al.*, 1986, 1989; Dallel *et al.*, 1988; Dubner *et al.*, 1989) y estudios inmunohistoquímicos (Anton *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Segade *et al.*, 1992; Boissonade *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Walther *et al.*, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Jasmin *et al.*, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1997a, 1998a,b; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Henry *et al.*, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Takemura *et al.*, 2000a; Chattipakorn *et al.*, 2005) han puesto de manifiesto la importancia del núcleo caudal como centro receptor de la información termoalgésica procedente de la región trigeminal, pese a que también juega un papel en la transmisión y modulación de la

información de naturaleza táctil (Kruger y Michel, 1962a,b; Wall y Taub, 1962; Azerad *et al.*, 1982).

La implicación del núcleo caudal en la mediación de los mecanismos nociceptivos trigeminales ha sido avalada por: a) la evidencia acumulada a partir de evaluaciones *post mortem* de pacientes con déficit en la percepción nociceptiva facial (Hun, 1897); b) el hallazgo de un estado de profunda analgesia y termanestesia en casi toda la región bucofacial, con mucha menor pérdida de la sensibilidad táctil, tras la sección del tracto espinal del nervio trigémino efectuada en el hombre a la altura del óbex (Sjöqvist, 1938, Weinberger y Grant, 1942; Hamby *et al.*, 1948); c) la existencia de actividad neuronal en el núcleo caudal, como consecuencia de la estimulación nociva orofacial efectuada en ratas (Nord, 1967; Shigenaga *et al.*, 1976; Dickenson *et al.*, 1981; Dallel *et al.*, 1988), gatos (Gordon *et al.*, 1961; Mosso y Kruger, 1973; Beuerman, 1975; Nord y Young, 1975; Yokota, 1975; Nord, 1976; Dostrovsky y Hellon, 1978; Dickenson *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hu y Sessle, 1984; Amano *et al.*, 1986) y monos (Nord y Ross, 1973; Price *et al.*, 1976; Hoffman *et al.*, 1981; Bushnell *et al.*, 1984; Maixner *et al.*, 1986, 1989; Dubner *et al.*, 1989).

Muchos estudios han examinado la expresión de *c-fos* y/o *c-fos* en el núcleo caudal, observándose que éste es inducido de forma rápida y transitoria como consecuencia de estímulos nocivos e inocuos (Anton *et al.*, 1991; Segade *et al.*, 1992; Strassman y Vos, 1993; Walther *et al.*, 1993; Jasmin *et al.*, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Takemura *et al.*, 2000a). La inmunorreactividad de *c-fos* registrada en este núcleo es mayor que en las otras divisiones del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2005). Según Takemura *et al.* (2000a, 2006), esta diferencia en los niveles de expresión de *c-fos* puede ser atribuida a que el núcleo caudal recibe un mayor número de proyecciones aferentes de pequeño diámetro (Beuerman, 1975; Nyberg y Blomqvist, 1984; Liang y Terashima, 1993), las cuales son efectivamente activadas en condiciones de inflamación y dolor craneofacial profundo. La estimulación eléctrica del ganglio de Gasser (Takemura *et al.*, 2000a), la estimulación mecánica (Strassman y Vos, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Vos y Strassman, 1995; Aihara *et al.*, 1999), química (Anton *et al.*,

1991; Segade *et al.*, 1992; Strassman y Vos, 1993; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2002, 2005), térmica (Strassman *et al.*, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Meng y Bereiter, 1996; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2005) y eléctrica (Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2005) nocivas de campos receptivos trigeminales, incluyendo la pulpa dental, así como la estimulación eléctrica de nervios periféricos trigeminales que inervan regiones orofaciales (Sugimoto *et al.*, 1998a) inducen inmunorreactividad de c-fos en neuronas de las láminas I-V del núcleo caudal. Sin embargo, todos estos estudios indican una localización preferente de las neuronas c-fos positivas en las láminas superficiales (I-II) y en la lámina V del núcleo caudal. Las neuronas de las láminas I y II del núcleo caudal que expresan c-fos están topográficamente organizadas, tanto en sentido dorsoventral como rostrocaudal (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Bereiter y Bereiter, 1996). Esta organización es similar a la distribución adoptada por las terminaciones centrales de neuronas primarias trigeminales en el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Åström, 1953; Torvik, 1956; Kruger *et al.*, 1961; Darian-Smith *et al.*, 1963; Kruger y Michel 1962a; Wall y Taub, 1962; Kerr, 1963; Kerr *et al.*, 1968; Rustioni *et al.*, 1971; Panneton y Burton, 1981; Jacquin *et al.*, 1983; Marfurt y Turner, 1984; Shigenaga *et al.*, 1986a,b,c, 1990; Takemura *et al.*, 1987, 1991, 1993; Tsuru *et al.*, 1989; Miyoshi *et al.*, 1994). Las neuronas con inmunorreactividad de c-fos que responden a la estimulación de campos receptivos situados en la división mandibular, maxilar y oftálmica se localizan en la zona dorsal, media y ventral del núcleo caudal, respectivamente. De la misma forma, las neuronas c-fos positivas cuyos campos receptivos están ubicados en la región intraoral se sitúan a nivel del polo rostródorsal del núcleo caudal, los campos receptivos de la zona perioral están representados en los tercios medio y caudal del núcleo caudal, y los que están ubicados en la región facial más periférica se hallan situados en la región caudal del núcleo caudal así como en el asta dorsal cervical.

El núcleo caudal recibe la proyección de aferentes primarias de pequeño diámetro CGRP y/o sustancia P inmunorreactivas, cuyo campo de terminación central coincide con la distribución anteriormente descrita de las neuronas que expresan c-fos (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Boissonade *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). La práctica de rizotomías retrogaserianas unilaterales, ha permitido comprobar que la inmunorreactividad de CGRP y sustancia P observada en el núcleo

caudal es atribuida fundamentalmente a fibras de origen trigeminal ipsilateral y, en menor medida también a fibras trigeminales contralaterales, faciales, glossofaríngeas, neumogástricas y cervicales (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). Estos hallazgos junto con el hecho de que las láminas superficiales del núcleo caudal constituyan el principal lugar de proyección de aferentes primarias de pequeño diámetro (Torvik, 1956; Kerr, 1963; Dubner *et al.*, 1976; Gobel y Binck, 1977; Jancso y Király, 1980; Arvidsson y Gobel, 1981; Panneton y Burton, 1981; Hayashi, 1985b; Jacquin *et al.*, 1986a; Shigenaga *et al.*, 1986a; Besson y Chaouch, 1987; Sessle, 1987; Sugimoto *et al.*, 1997a,b) y que, la deaferenciación del núcleo caudal afecte principalmente a la sensibilidad nociceptiva de la cara y en menor medida a la sensibilidad de regiones intraorales (p. ej. Young y Perryman, 1986; Dallel *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1988), avalan la idea de que el núcleo caudal está implicado principalmente en la codificación de la información nociceptiva de la región facial, la cual es transmitida hasta este centro de segundo orden fundamentalmente por fibras aferentes primarias de pequeño diámetro.

Atendiendo a la capacidad de respuesta a diversos estímulos cutáneos así como al tipo de fibras aferentes primarias de proyección, en el núcleo caudal del trigémino, al igual que en el asta dorsal de la médula espinal de gatos y monos (Price y Mayer, 1974; Price y Browe, 1975), se han identificado tres tipos principales de neuronas nociceptivas: neuronas de clase 3, clase 4 y clase 5 (Price *et al.*, 1976). Sin embargo, la mayoría de los autores agrupan las dos últimas categorías refiriéndose a ellas como neuronas nociceptivas específicas o neuronas mecanosensitivas de umbral alto (Mosso y Kruger, 1973; Price y Dubner, 1977; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Dubner y Bennett, 1983; Hu y Sessle, 1984; Amano *et al.*, 1986; Maixner *et al.*, 1986, 1989; Dubner *et al.*, 1989). Las **neuronas de clase 3**, también denominadas neuronas de límite vasto y dinámico (Yokota *et al.*, 1981; Lucier y Egizii, 1989) o neuronas nociceptivas convergentes (Raboisson *et al.*, 1995) reciben impulsos aferentes de diámetro grande (fibras mecanosensitivas A β) y reducido (fibras nociceptivas térmicas A δ y/o fibras nociceptivas polimodales C) y son activadas tanto por estímulos mecánicos y térmicos nocivos como por estímulos mecánicos no perjudiciales (tacto ligero y presión) aplicados a un campo receptivo amplio. Las **neuronas de clase 4**, principalmente reciben fibras aferentes primarias nociceptivas térmicas A δ y mecanosensitivas de alto umbral A δ , aunque algunas veces también fibras nociceptivas

polimodales C y fibras mecanosensitivas de presión moderada A δ . A diferencia de las anteriores, no responden a estímulos mecánicos de baja intensidad, aunque sí a estímulos mecánicos y térmicos nocivos y a la presión firme pero inocua circunscritos a un reducido campo receptivo. Por último, las **neuronas de clase 5**, que al igual que las neuronas de clase 4 suelen presentar un pequeño campo receptivo, sólo reciben impulsos aferentes de diámetro pequeño (fibras mecanosensitivas de alto umbral A δ) y únicamente responden a estímulos mecánicos nocivos, aunque rara vez también lo hacen a estímulos térmicos perjudiciales. Las neuronas nociceptivas específicas (clases 4 y 5) se corresponden con las neuronas espinotalámicas de umbral alto identificadas por Willis *et al.* (1974), mientras que las neuronas de clase 3 son similares a las neuronas espinotalámicas de la lámina V del asta dorsal de la médula espinal reconocidas por Price y Mayer (1974), Willis *et al.* (1974) y Price y Browe (1975). Las neuronas de límite vasto y dinámico se caracterizan por presentar un campo receptivo con un área central que responde tanto a estímulos nocivos como inocuos, rodeada por una zona periférica más grande y con límites mal definidos, desde la cual las neuronas pueden ser activadas únicamente por estímulos nocivos o bien por estímulos nocivos e inocuos (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Dubner y Bennett, 1983). De las tres categorías de neuronas nociceptivas presentes en el núcleo caudal, las de clase 3 son las que presentan la mayor velocidad de conducción. Esta diferencia les ha permitido a Price y Mayer (1975) y a Mayer *et al.* (1975) determinar que, en el hombre, su activación es suficiente para la aparición del dolor, sin necesidad de que los otros dos tipos de neuronas sean estimuladas. Las neuronas de límite vasto y dinámico reciben una mayor entrada de aferentes tipo C que las neuronas nociceptivas específicas (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981), a diferencia de lo que se observa en neuronas espinotalámicas, donde la proporción es a la inversa (Chung *et al.*, 1979). Hu *et al.* (1981) observaron que el 56% de las neuronas de límite vasto y dinámico presentaban entradas de fibras C, frente al 29% de las neuronas nociceptivas específicas. Por otra parte, las neuronas de clase 3 presentan diferencias con respecto a las otras dos categorías en cuanto a su localización dentro del núcleo caudal. Las neuronas de límite vasto y dinámico suelen ubicarse predominantemente en las láminas V y VI, salvo aquellas con campos receptivos pequeños (de hasta 1 cm²) que tienden a concentrarse en las láminas III-IV ó I-II (Mosso y Kruger, 1973; Price *et al.*, 1976; Dubner y Bennet, 1983; Hu y Sessle, 1984; Sessle, 1987). Por el contrario, las neuronas mecanosensitivas de umbral alto que presentan campos receptivos pequeños (inferiores a 2 cm²) se

localizan principalmente en las láminas I y II, mientras que aquellas con campos receptivos medianos o grandes lo hacen en las láminas V y VI (Mosso y Kruger, 1973; Yokota, 1975; Price *et al.*, 1976; Yokota *et al.*, 1979, 1981; Hu y Sessle, 1984). Por tanto, al igual que ha sido visto en la médula espinal (Price y Mayer, 1974, 1975; Willis *et al.*, 1974; Handwerker *et al.*, 1975), las neuronas que responden predominantemente a estímulos mecánicos y térmicos nocivos (neuronas de clases 4 y 5) tienden a situarse en las láminas I y II, con un menor número de neuronas que también responden a estímulos mecánicos inocuos (neuronas de clase 3) presentes en dichas láminas.

Los tres tipos de neuronas nociceptivas anteriormente citadas, intervienen en la codificación de las características sensoriodiscriminativas de estímulos dolorosos (localización, intensidad, duración y calidad). Esta afirmación viene avalada por las siguientes observaciones: a) subpoblaciones de estas tres categorías neuronales proyectan a regiones talámicas que intervienen en la codificación de la dimensión sensoriodiscriminativa de estímulos somáticos nocivos (Dubner y Bennett, 1983); b) la estimulación selectiva de neuronas de límite vasto y dinámico conlleva la aparición de dolor (Mayer *et al.*, 1975; Price y Mayer, 1975); c) el tipo de respuesta de las tres categorías neuronales se correlaciona con la capacidad para discriminar entre estímulos nocivos e inocuos (Bushnell *et al.*, 1984; Hoffman *et al.*, 1981). Sin embargo, las neuronas nociceptivas específicas han sido implicadas principalmente en la transmisión de la información relacionada con la localización del dolor (Yokota *et al.*, 1979; Dubner y Bennett, 1983), mientras que las neuronas de clase 3 se ha dicho que contribuyen fundamentalmente a la percepción de la intensidad del estímulo nocivo (Nord y Young, 1975; Price *et al.*, 1976; Azerad *et al.*, 1982; Amano *et al.*, 1986; Maixner *et al.*, 1986, 1989; Dubner *et al.*, 1989). Por otra parte, las neuronas nociceptivas específicas también han sido implicadas en las dimensiones motivacional y afectiva relacionadas con experiencias previas acerca del dolor (Price y Dubner, 1977), y no solamente en la dimensión sensoriodiscriminativa.

Siguiendo los mismos criterios descritos para clasificar las neuronas nociceptivas, en el núcleo caudal se diferencian dos categorías principales de células nerviosas no nociceptivas: neuronas de clase 1 y clase 2 (Price *et al.*, 1976), también denominadas neuronas mecanosensitivas de umbral bajo de adaptación rápida y de adaptación lenta (Mosso y Kruger, 1973; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984) o neuronas táctiles de adaptación rápida y de adaptación lenta (Azerad *et al.*, 1982), respectivamente. Estos dos tipos neuronales, pese a no haber sido diferenciadas en el

asta dorsal de la médula espinal de primates por Willis *et al.* (1974), utilizando como criterio el estímulo mecánico de menor intensidad capaz de activarlas, sí han sido reconocidas en el asta dorsal de la médula espinal de gatos por Price y Browe (1975) y de monos por Price y Mayer (1974).

Ambas categorías de neuronas se ha visto que presentan características muy similares: generalmente sólo reciben aferentes mecanosensitivas trigeminales de rápida velocidad de conducción (fibras A β), únicamente son activadas por estímulos mecánicos inocuos aplicados a campos receptivos pequeños (1-5 mm²) con límites bien definidos y generalmente se localizan en las láminas III-IV, aunque también en las láminas V-VI (Darian-Smith, 1966; Mosso y Kruger, 1973; Nord, 1976; Price *et al.*, 1976; Price y Dubner, 1977; Dubner *et al.*, 1978; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Dubner y Bennett, 1983; Hu y Sessle, 1984; Lucier y Egizii, 1989). De la misma manera que se ha comentado en relación con las neuronas nociceptivas específicas, el hecho de que presenten reducidos campos receptivos es consistente con la hipótesis de que este tipo de neuronas intervienen en la codificación de la localización del estímulo (Dubner y Bennett, 1983). La principal diferencia entre ambos tipos neuronales radica en que las neuronas de clase 2 presentan una adaptación más lenta a los estímulos mecánicos continuados que las de clase 1 (Price *et al.*, 1976). Las neuronas trigeminotalámicas de clase 1 y clase 2 presentan características electrofisiológicas similares a las neuronas espinotalámicas localizadas en la lámina IV del asta dorsal de la médula espinal (Willis *et al.*, 1974; Price y Mayer, 1975).

Las neuronas de clase 1 y 2 situadas en las láminas III y IV y las neuronas nociceptivas localizadas en las láminas I y II presentan una organización somatotópica dorsoventral y rostrocaudal. En el gato (Mosso y Kruger, 1973; Dostrovsky y Hellon, 1978; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982) y en el mono (Price *et al.*, 1976), las neuronas cuyos campos receptivos se hallan dentro de la división mandibular del nervio trigémino se localizan dorsomedialmente en el núcleo caudal; las que lo tienen dentro de la división oftálmica se sitúan ventrolateralmente y las que lo poseen en la división maxilar se localizan entre las dos anteriores. Esta organización dorsoventral es difícil de determinar en las láminas V y VI debido al gran campo receptivo que presentan las neuronas ubicadas en dichas láminas (al menos de la extensión correspondiente a una división del nervio trigémino) (Price *et al.*, 1976). Tal y como fue sugerido por Kunc (1970) a partir de los efectos derivados de la tractotomía de la vía espinal del nervio trigémino, y posteriormente confirmado por Yokota (1975)

y Yokota *et al.* (1981) mediante estudios electrofisiológicos realizados en el gato, las fibras nociceptivas del centro de la cara terminan en la zona rostral del núcleo caudal, mientras que las correspondientes a las zonas periféricas faciales lo hacen en niveles más caudales.

De todo lo mencionado anteriormente se vislumbra que, la información somatosensorial de la región orofacial es codificada por grupos de neuronas del núcleo caudal funcionalmente heterogéneos y por tanto, transmitida a centros nerviosos superiores mediante diferentes sistemas de proyección (Price *et al.*, 1976).

1.3.2. Núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino

Los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino (núcleos principal, oral e interpolar) son importantes centros de retransmisión de la información táctil bucofacial (Eisenman *et al.*, 1963; Dubner *et al.*, 1978; Azerad *et al.*, 1982; Hu y Sessle, 1984; Olsson *et al.*, 1988); sin embargo, también han sido implicados en la recepción de la sensibilidad nociceptiva orofacial mediante estudios electrofisiológicos (p. ej. Eisenman *et al.*, 1963; Greenwood, 1973; Vyklicky y Keller, 1973; Greenwood y Sessle, 1976; Nord, 1976; Sessle y Greenwood, 1976; Woda *et al.*, 1977; Azerad *et al.*, 1982; Clarke, 1984; Hayashi *et al.*, 1984; Young y Perryman, 1986; Dallel *et al.*, 1988, 1989 y 1990; Raboisson *et al.*, 1991), de análisis de comportamiento (Vyklicky *et al.*, 1977; Young *et al.*, 1981; Young y Perryman, 1984) y anatómicos usando inyecciones de HRP en la pulpa dentaria de gatos (Arvidsson y Gobel, 1981; Westrum *et al.*, 1981; Shigenaga *et al.*, 1986c) y ratas (Marfurt y Turner, 1984).

La reevaluación exhaustiva de los efectos derivados de una tractotomía trigeminal, realizada inmediatamente por encima del núcleo caudal, ha permitido comprobar que ésta no produce un cese de la actividad neuronal nociceptiva talámica como consecuencia de estímulos orofaciales (Dong y Chudler, 1984, Dallel *et al.*, 1988; Raboisson *et al.*, 1989). Igualmente, esta práctica no induce una supresión completa de las respuestas reflejas nociceptivas observadas en animales después de aplicar estímulos orofaciales y dentales nocivos (Sumino, 1971; Denny-Brown y Yanagisawa, 1973; Azerad y Woda, 1976; Greenwood y Sessle, 1976; Vyklicky *et al.*, 1977; Nord y Young, 1979; Sessle y Hu, 1981; Young *et al.*, 1981; Broton y Rosenfeld, 1982, 1985; Young y Perryman, 1984, 1986; Dallel *et al.*, 1989). De la misma forma, tampoco

conlleva un estado total de analgesia dental y orofacial en humanos (McKenzie, 1955; Young, 1982; Graham *et al.*, 1988). Por el contrario, se ha visto que lesiones más rostrales disminuyen la nocicepción oral y perioral (Broton y Rosenfeld, 1982, 1986; Young y Perryman, 1984). Por ejemplo, Young y Perryman (1986) estudiaron la capacidad que presentaban los monos para percibir estímulos nocivos posteriormente a la práctica de una tractotomía trigeminal realizada a nivel del óbex. Estos investigadores observaron que, tras la sección del tracto trigeminal, la discriminación de la información nociceptiva en la cara estaba afectada, mientras que la discriminación de estímulos nocivos intraorales permanecía intacta.

Al margen de las tractotomías, existen otros hallazgos que refuerzan la participación de los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino en la transmisión del dolor. En este sentido puede citarse la identificación de numerosos axones que contienen neuropéptidos relacionados con la sensibilidad nociceptiva (CGRP) (Batten *et al.*, 1988; Kruger *et al.*, 1988a,b; Tashiro *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Stover *et al.*, 1992; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a), que establecen sinapsis fundamentalmente con neuronas del núcleo oral en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) y del núcleo principal en el gato (Tashiro *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1996). De la misma forma, se ha observado una importante proyección de fibras aferentes pulpares a los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Khayyat *et al.*, 1975; Nord, 1976; Sessle y Greenwood, 1976; Lisney, 1978; Nord y Young, 1979; Westrum *et al.*, 1980, 1981; Arvidsson y Gobel, 1981; Dostovsky *et al.*, 1981; Sessle y Hu, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984; Marfurt y Turner, 1984; Ishidori *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986c, 1989; Turner y Marfurt, 1988; Henry y Westrum, 1990; Takemura *et al.*, 1991, 1993), las cuales mayoritariamente, aunque no exclusivamente, transmiten sensaciones dolorosas (Anderson *et al.*, 1970; Bratzlavsky *et al.*, 1976; Biedenbach *et al.*, 1979; Chatrian *et al.*, 1982). Estudios de marcaje retrógrado en combinación con estudios inmunohistoquímicos, han permitido identificar dos subpoblaciones principales de neuronas primarias trigeminales que inervan la pulpa dentaria de la rata: neuronas con inmunorreactividad de CGRP y neuronas que contienen parvalbúmina. Estas subpoblaciones representan el 50% y el 30% de las neuronas primarias que inervan la pulpa, respectivamente (Ichikawa *et al.*, 1995). Las aferentes pulpares también han sido observadas en el núcleo caudal (Greenwood, 1973; Nord y Young, 1975; Yokota, 1975; Nord, 1976; Sessle *et al.*, 1976; Shigenaga *et al.*, 1976; Lisney, 1978; Arvidsson y Gobel, 1981; Dickenson *et al.*, 1981;

Hu *et al.*, 1981; Marfurt y Turner, 1984; Pertovaara *et al.*, 1987a; Lucier y Egizzi, 1989; Takemura *et al.*, 1991, 1993), sin embargo, evaluaciones cuantitativas (Gerard, 1923; Davies *et al.*, 1971; Greenwood, 1973; Sessle *et al.*, 1976) han revelado la existencia de una proyección predominante en los núcleos más rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino (núcleos principal y oral).

Los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino se ha sugerido que intervienen en la transmisión de la información nociceptiva a centros superiores (complejo ventrobasal del tálamo) procedente, principalmente, de zonas intraorales y periorales y en menor medida de zonas faciales cutáneas. Esta hipótesis se ha sustentado en observaciones derivadas de la inducción de lesiones en el tronco encefálico y de la práctica de tractotomías trigeminales experimentales o terapéuticas llevadas a cabo en el hombre (Grant *et al.*, 1940; Young, 1982; Graham *et al.*, 1988), en la rata (Brotton y Rosenfeld, 1985; Dallel *et al.*, 1989; Raboisson *et al.*, 1989), en el mono (Young *et al.*, 1981; Young y Perryman, 1984) y en el gato (Azerad y Woda, 1976; Vyklicky *et al.*, 1977). Además, se ha visto que las respuestas de estas neuronas nociceptivas de los núcleos rostrales del trigémino están influenciadas por neuronas del núcleo caudal mediante tractos intratrigeminales (Young y King, 1972; Denny-Brown y Yanagisawa, 1973; Sessle y Greenwood, 1974, 1976; Khayyat *et al.*, 1975; Greenwood y Sessle, 1976; Nord y Young, 1979; Hu *et al.*, 1981; Sessle y Hu, 1981; Ujihara *et al.*, 1987; Dallel *et al.*, 1989), a diferencia de lo que han observado Raboisson *et al.* (1989) en la rata, Young y Perryman (1986) en el mono y Nasution y Shigenaga (1987) en el gato. En este sentido, y a modo de ejemplo, podrían citarse estudios llevados a cabo por el grupo de investigación de Dallel. Dallel *et al.* (1998) observaron que la microinyección de morfina en el núcleo caudal inhibía las actividades nociceptivas de neuronas del núcleo oral del trigémino. Por otra parte, Dallel *et al.* (1989), tras realizar la sección del tracto espinal del nervio trigémino, constataron una disminución de los umbrales necesarios para la aparición de reacciones nociceptivas inducidas por estimulación de la pulpa dentaria contralateral. Este último hallazgo sugiere que el núcleo caudal ejerce una influencia inhibitoria en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino contralaterales.

Todos los hallazgos anteriormente citados avalan la implicación de los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino en la codificación de la información dolorosa intraoral y/o perioral. Sin embargo, también existen evidencias que abogan por la participación del núcleo caudal del trigémino en la sensibilidad

nociceptiva de la región media facial (Hu *et al.*, 1981; Carstens *et al.*, 1995; Chattipakorn *et al.*, 2005). La deaferenciación o la lesión del núcleo caudal del trigémino ejerce un efecto diferente sobre las respuestas nociceptivas orales y/o periorales mediadas por fibras A δ y C (Pajot *et al.*, 2000). Aquellas respuestas que son transmitidas por fibras C, como es la conducta relacionada con el dolor secundaria a la formalina, son procesadas exclusivamente en el núcleo caudal, siendo por tanto inhibidas por la tractotomía trigeminal (Vycklicky *et al.*, 1977; Dallel *et al.*, 1989; Luccarini *et al.*, 1998; Pajot *et al.*, 2000). Por el contrario, las respuestas mediadas por fibras A δ , tales como el reflejo de apertura mandibular como consecuencia de la estimulación pulpar, son procesadas principalmente en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, lo que supone que no se ven afectadas o bien son poco afectadas por dicha práctica quirúrgica (Keller *et al.*, 1974; Azerad y Woda, 1976; Vycklicky *et al.*, 1977; Nord y Young, 1979; Dong y Chudler, 1984; Young y Perryman, 1986; Dallel *et al.*, 1989; Raboisson *et al.*, 1989; Pajot *et al.*, 2000).

a) Núcleo oral

El núcleo caudal del trigémino se ha considerado el principal núcleo de transmisión de la información nociceptiva trigeminal a centros superiores (p. ej. Sjöqvist, 1938; Darian-Smith, 1966; Mosso y Kruger, 1973; Price *et al.*, 1976; Dubner *et al.*, 1978; Fukushima y Kerr, 1979; Gobel *et al.*, 1981b; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984). Sin embargo, y principalmente a partir de la década de los 70, se han realizado multitud de investigaciones que también avalan la participación del núcleo oral en la codificación de la sensibilidad nociceptiva (p. ej. Davies *et al.*, 1971; Denny-Brown y Yanagisawa, 1973; Greenwood, 1973; Azerad y Woda, 1976; Greenwood y Sessle, 1976; Sessle *et al.*, 1976; Vycklicky *et al.*, 1977; Nord y Young, 1979; Sessle y Hu, 1981; Young *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Broton y Rosenfeld, 1982, 1985, 1986; Young, 1982; Hu y Sessle, 1984; Young y Perryman, 1984; Graham *et al.*, 1988; Dallel *et al.*, 1989, 1990). Los resultados contradictorios hallados entre diferentes estudios han generado una gran incertidumbre acerca de las verdaderas propiedades funcionales del núcleo oral. Esta discrepancia, en parte, puede ser atribuida a diferencias a la hora de establecer los límites entre los dos núcleos más rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino. En este sentido cabe señalar que, mientras que

Verhaart (1964), Berman (1968), Karamanlidis (1968) y Azerad *et al.* (1982) han situado el límite rostral del núcleo oral a la altura del polo caudal del núcleo motor del trigémino; Torvik (1957) y Eisenman *et al.* (1963) lo han ubicado a niveles más caudales.

Múltiples hallazgos experimentales han corroborado la implicación del núcleo oral en la transmisión de la información nociceptiva orofacial. Se ha observado que (a) el núcleo oral de gatos (Beurman, 1975; Hayashi, 1985b; Batten *et al.*, 1988; Henry *et al.*, 1996) y ratas (Falls y Alban, 1986b; Batten *et al.*, 1988; Falls, 1988; Kruger *et al.*, 1988a,b; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992) recibe la proyección de aferentes de pequeño diámetro, muchas de las cuales presentan CGRP; (b) estudios electrofisiológicos han identificado neuronas nociceptivas en el núcleo oral (Azerad *et al.*, 1982; Dallel *et al.*, 1990; Parada *et al.*, 1997), con propiedades similares a las de las neuronas nociceptivas (neuronas de límite vasto y dinámico y neuronas nociceptivas específicas) vistas en otros núcleos del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Price *et al.*, 1976; Hoffman *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984) y en el asta dorsal de la médula espinal (Price y Mayer, 1974; Price y Browe, 1975); (c) neuronas del núcleo oral proyectan al complejo ventrobasal del tálamo (Sessle y Greenwood, 1976; Azerad *et al.*, 1982) así como al núcleo caudal del trigémino (Hockfield y Gobel, 1982; Ikeda *et al.*, 1984; Nasution y Shigenaga, 1987), regiones ampliamente conocidas por ser lugares de proyección de aferentes nociceptivas (Gordon *et al.*, 1961; Nord y Young, 1975; Yokota, 1975; Price *et al.*, 1976; Guilbaud *et al.*, 1980; Honda *et al.*, 1983; Yokota y Matsumoto, 1983a, 1983b); (d) lesiones inducidas en la vecindad del núcleo oral interfieren en la sensibilidad nociceptiva orofacial secundaria a estímulos mecánicos y térmicos nocivos (Young y Perryman, 1984; Broton y Rosenfeld, 1986; Graham *et al.*, 1988).

El núcleo oral del trigémino ha sido implicado en la recepción de impulsos nociceptivos procedentes principalmente de regiones intraorales y/o periorales, y en menor medida de zonas faciales más periféricas, en la que cobra un mayor protagonismo el núcleo caudal (Denny-Brown y Yanagisawa, 1973; Young y Perryman, 1984, 1986; Dallel *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1988). La tractotomía de la vía espinal trigeminal realizada en humanos (Hamby *et al.*, 1948; Grant, 1955; McKenzie, 1955; Young, 1982; Graham *et al.*, 1988) y en animales (Denny-Brown y Yanagisawa, 1973; Azerad y Woda, 1976; Greenwood y Sessle, 1976; Vyklicky *et al.*, 1977; Nord y Young, 1979; Sessle y Hu, 1981; Young *et al.*, 1981; Broton y Rosenfeld, 1982, 1985;

Young y Perryman, 1984; Dallel *et al.*, 1988, 1989) no altera la sensibilidad dolorosa de la zona media de la cara, y en concreto de la cavidad oral. Igualmente, la lesión del núcleo oral (Rosenfeld *et al.*, 1978; Young y Perryman, 1984; Pickoff-Matuk *et al.*, 1986; Luccarini *et al.*, 1998) así como la sección de sus proyecciones eferentes (Brotton y Rosenfeld, 1986) se han asociado con estados de hipoalgesia en la zona facial media. Por otra parte, se ha detectado expresión de c-fos como consecuencia de una estimulación nociva en regiones del núcleo oral que constituyen el principal campo de terminación de aferentes primarias que inervan estructuras orales (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a; Takemura *et al.*, 2000a). Todas estas observaciones justifican que Wall y Taub (1962) y Azerad *et al.* (1982), y en menor grado también otros autores (Eisenman *et al.*, 1963; Kerr *et al.*, 1968), hayan considerado al núcleo oral como la representación central de la cavidad oral.

Estudios electrofisiológicos realizados en el gato (Sumino, 1971; Azerad y Woda 1976; Vyklicky *et al.*, 1977; Ikegami y Kawamura, 1979; Dong y Chudler, 1984), en el mono (Young *et al.*, 1981; Young y Perryman, 1984) y en la rata (Brotton y Rosenfeld, 1985; Dallel *et al.*, 1988, 1989; Raboisson *et al.*, 1989) también constituyen una evidencia de la participación de los núcleos caudal y oral en la codificación de la información nociceptiva facial y oral/perioral, respectivamente. En este sentido, se ha observado que la deaferenciación del núcleo caudal no altera las respuestas neuronales talámicas ni las actividades reflejas nociceptivas (ej. reflejo de apertura mandibular) inducidas por estímulos nocivos orales o periorales, mientras que por el contrario, interfiere con las reacciones nociceptivas asociadas a estímulos perjudiciales faciales. De la misma forma, la destrucción del núcleo oral o la sección de sus proyecciones eferentes no modifica la actividad cortical asociada a estímulos faciales pero sí conlleva una alteración de las respuestas neuronales del córtex somatosensorial y de las reacciones de comportamiento secundarias a una estimulación nociva oral/perioral (Keller *et al.*, 1974; Brotton y Rosenfeld, 1982, 1986). Estos hallazgos ponen de manifiesto que el núcleo oral no solamente interviene en los aspectos afectivos o discriminativos espacio-temporales del dolor (p. ej. localización) (Sessle y Greenwood, 1976), sino que también está implicado en actividades reflejas relacionadas con dicha modalidad sensitiva (Azerad *et al.*, 1982; Clarke, 1984; Hu y Sessle, 1984), a diferencia de lo que se ha sugerido (Azerad y Woda 1976; Matthews *et al.*, 1976; Dubner *et al.*, 1978).

En la mayoría de los estudios electrofisiológicos encaminados a determinar las propiedades funcionales de las neuronas del núcleo oral, se han utilizado estímulos nocivos agudos, bien sean mecánicos o eléctricos (Sessle y Greenwood, 1976; Azerad *et al.*, 1982; Hu y Sessle, 1984; Dallel *et al.*, 1990). Sin embargo, el empleo de estímulos nocivos persistentes (p. ej. formalina) ha permitido ahondar más en el conocimiento de la transmisión de la información nociceptiva. Las neuronas nociceptivas específicas del núcleo oral únicamente median la transmisión de información dolorosa aguda, tal y como se evidencia por la ausencia de respuesta bifásica en estas neuronas tras la inyección subcutánea de formalina en su campo receptivo periférico (Raboisson *et al.*, 1991). Por el contrario, y no solamente en el núcleo oral, sino también en el núcleo caudal y en el asta dorsal de la médula espinal, las neuronas nociceptivas convergentes presentan una mayor heterogeneidad en la respuesta a la formalina. Todas las neuronas nociceptivas convergentes del asta dorsal espinal activadas por este estímulo químico presentan una respuesta con dos componentes (Dickenson y Sullivan, 1987a, 1987b; Haley *et al.*, 1989;1990; Sotgiu, 1989), que es similar a la respuesta bifásica motora observada en estudios de análisis de comportamiento (Dubuisson y Dennis, 1977; Hunskaar y Hole, 1987; Clavelou *et al.*, 1989). Sin embargo, otros estudios han observado que la respuesta bifásica inducida por la formalina sólo ocurre en algunas neuronas nociceptivas convergentes del núcleo oral, principalmente aquellas que reciben aferentes primarias A δ y C (Raboisson *et al.*, 1991), del núcleo caudal, especialmente las que reciben fibras aferentes C (Raboisson *et al.*, 1995), o del asta dorsal espinal (Banna *et al.*, 1986). Raboisson *et al.*, (1995) han tratado de explicar el porqué neuronas que presentan las mismas características funcionales responden de modo diferente a un mismo estímulo periférico. Según estos autores, en los núcleos oral y caudal existen neuronas que sólo reciben aferentes que son directamente excitadas por la formalina pero no aferentes sensibles a los mediadores inflamatorios, estas células representarían las neuronas monofásicas. Por el contrario, otras neuronas reciben ambos tipos de fibras aferentes, y las cuales constituirían la población neuronal de respuesta bifásica. Esta dualidad de respuesta es reflejo del diferente papel funcional que juegan neuronas bifásicas y monofásicas en la transmisión de la información nociceptiva (Raboisson *et al.*, 1995). El núcleo caudal presenta un mayor número de neuronas bifásicas que el núcleo oral, siendo además la segunda fase de las respuestas de las neuronas bifásicas del núcleo caudal más duradera que las del núcleo oral (Raboisson *et al.*, 1995). Además, las neuronas del núcleo oral pueden estar sometidas a un mayor

control inhibitorio descendiente que las del núcleo caudal, el cual es sabido que es más efectivo cuando existe un proceso inflamatorio agudo (Schaible *et al.*, 1991). Estas observaciones ponen de manifiesto que el núcleo oral está menos implicado en el procesamiento de la información nociceptiva tónica de origen inflamatorio que el núcleo caudal.

Estudios inmunohistoquímicos, de proyección y electrofisiológicos han puesto de manifiesto que la información nociceptiva en el núcleo oral es codificada principalmente en la región dorsomedial. La expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino principalmente es inducida en el núcleo caudal así como en la transición entre los núcleos caudal e interpolar del trigémino (Anton *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Kato *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2005). Sin embargo, la estimulación nociva de estructuras orales así como la estimulación eléctrica del ganglio de Gasser y de los nervios trigeminales que inervan regiones orales inducen inmunorreactividad de c-fos en neuronas de la región dorsomedial del núcleo oral, casi exclusivamente a nivel ipsilateral (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Takemura *et al.*, 2000a). Además, la localización de las neuronas con c-fos en el núcleo oral es similar a la distribución de las neuronas nociceptivas identificadas electrofisiológicamente en dicho núcleo (Dallel *et al.*, 1990). Estas neuronas del núcleo oral con inmunorreactividad de c-fos son activadas por entradas primarias nociceptivas monosinápticas desde estructuras intraorales. Esta afirmación se sustenta en que sólo estímulos nociceptivos intraorales inducen expresión de c-fos en neuronas del núcleo oral (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000) y la región dorsomedial del núcleo oral únicamente recibe proyecciones de neuronas primarias trigeminales que inervan campos receptivos peri e intraorales (Arvidsson y Gobel, 1981; Marfurt, 1981; Westrum *et al.*, 1981; Jacquin *et al.*, 1983; Woda *et al.*, 1983; Marfurt y Turner 1984; Shigenaga *et al.*, 1986b,c, 1989; Takemura *et al.*, 1987, 1991, 1993; Tsuru *et al.*, 1989; Tabata y Karita, 1991).

Las subdivisiones dorsomediales (subdivisiones dorsomedial y rostradorsomedial) y la región marginal lateral del núcleo oral reciben una importante proyección de neuronas primarias nociceptivas que contienen sustancia P y/o CGRP

(Takemura *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Sugimoto *et al.*, 1997a, 1998a; Henry *et al.*, 1996). La proyección a las subdivisiones dorsomediales es puramente trigeminal, mientras que la proyección a la región marginal del núcleo oral es de origen mixto (trigeminal, facial, vagal, glossofaríngeo y cervical), tal y como se comprueba por la persistencia de fibras CGRP inmunorreactivas en esta zona lateral tras la rizotomía retrogaseriana trigeminal unilateral (Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). Las fibras aferentes de la división mandibular, y posiblemente también de la división maxilar, son las que proyectan al núcleo oral dorsal y poseen inmunoreactividad para CGRP, puesto que las aferentes primarias trigeminales presentan una organización somatotópica dorsoventral (Kruger *et al.*, 1961; Kruger y Michel 1962a; Wall y Taub, 1962; Eisenman *et al.*, 1963; Kerr, 1963; Kerr *et al.*, 1968; Sessle y Greenwood, 1976; Marfurt, 1981; Jacquin *et al.*, 1983; Matesz, 1983; Falls y Alban, 1986b; Shigenaga *et al.*, 1986b; Falls, 1988; Dallel *et al.*, 1990). Las neuronas del núcleo oral que expresan c-fos son activadas principalmente por fibras aferentes primarias de pequeño calibre. Así, el territorio de proyección central de neuronas primarias nociceptivas trigeminales CGRP o sustancia P inmunorreactivas (Sugimoto *et al.*, 1997a, 1998a) así como el de neuronas primarias trigeminales marcadas con el conjugado *Bandeiraea simplicifolia* isolectina B4 (IB4) (Sugimoto *et al.*, 1997b), un trazador específico de neuronas primarias no mielinizadas, se solapa con las regiones del núcleo oral donde se ha observado expresión de c-fos. La información nociceptiva de las estructuras intraorales es transmitida a las neuronas del núcleo oral dorsomedial y del núcleo caudal mediante aferentes primarias nociceptivas mielinizadas y no mielinizadas (He *et al.*, 2000). Así, la destrucción selectiva de neuronas primarias nociceptivas trigeminales, mediante un tratamiento con capsaicina, sólo atenuó pero no suprimió completamente la expresión de c-fos en ambos núcleos como consecuencia de una estimulación nociva intraoral.

La región dorsomedial del núcleo oral tiene neuronas implicadas en el control de reflejos sensoriomotores y en la modulación de la información sensitiva (Dubner *et al.*, 1978; Fukushima y Kerr, 1979; Shigenaga *et al.*, 1986b,c, 1988c, 1989, 1990; Yoshida *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995). La región dorsomedial del núcleo oral proyecta al núcleo motor del trigémino (Mizuno *et al.*, 1983; Landgren *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1988c; Fort *et al.*, 1990; Olsson y Westberg, 1991; Yoshida *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995), al núcleo parabraquial (Allen *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997), al cerebelo (Falls *et al.*, 1985), al núcleo motor del facial (Yoshida *et al.*, 1994), y a otros núcleos del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Hockfield y Gobel, 1982; Ikeda *et al.*, 1984; Nasution y

Shigenaga, 1987; Jacquin y Rhoades, 1990; Yoshida *et al.*, 1994), pero presenta pocas proyecciones al núcleo ventral posteromedial del tálamo (Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Shigenaga *et al.*, 1983; Yasui *et al.*, 1983). Estas proyecciones justifican que las neuronas del núcleo oral dorsomedial que expresan c-fos además de estar implicadas en la recepción de entradas nociceptivas periféricas, también modulen la transmisión de la información sensitiva y controlen respuestas reflejas cardiovasculares, respiratorias, mandibulares u orofaciales (Yoshida *et al.*, 1994; Oakden y Boissonade, 1998; Takemura *et al.*, 2000a, 2006). En este sentido, Allen *et al.* (1996) observaron que el 38% de las neuronas de la región dorsomedial del núcleo oral con inmunorreactividad de c-fos proyectaban al núcleo parabraquial lateral, una región implicada en la regulación de la función cardiovascular y respiratoria (Hamilton *et al.*, 1981; Mraovitch *et al.*, 1982; Chamberlin y Saper, 1992; Lara *et al.*, 1994).

b) Núcleo interpolar

Hasta la década de los años 80, las investigaciones relacionadas con la transmisión de información nociceptiva de la región trigeminal se centraron en el estudio de las características morfológicas y funcionales de los núcleos oral y caudal. Sin embargo, a partir de esta fecha hubo un aumento del interés por el estudio del núcleo interpolar. Así, las experiencias comenzaron a centrarse en determinar la existencia y características de posibles entradas aferentes nociceptivas trigeminales al núcleo interpolar (Westrum *et al.*, 1980; Arvidsson y Gobel, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Marfurt y Turner, 1984; Hayashi, 1985b; Shigenaga *et al.*, 1986c; Pertovaara *et al.*, 1987b; Lucier y Egizii, 1989; Clarke y Matthews, 1990; Boissonade *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a), el grado de respuesta a estímulos nocivos (Allen *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Takemura *et al.*, 2000a), las propiedades funcionales de las neuronas de dicho núcleo (Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984; Young y Perryman, 1986) y las proyecciones eferentes de las mismas (Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Erzurumlu y Killackey, 1980; Ruggiero *et al.*, 1981; Sumino *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1982; Woolston *et al.*, 1982; Shigenaga *et al.*, 1983, 1986c; Bruce *et al.*, 1987; Ohya *et al.*, 1993).

Estudios anatómicos con inyecciones intraaxonales de HRP han revelado que aferentes primarias nociceptivas cutáneas A δ envían colaterales a la región superficial

del núcleo interpolar (Hayashi, 1985b). De la misma forma, inyecciones intrapulpares de este mismo trazador (Westrum *et al.*, 1980; Arvidsson y Gobel, 1981; Marfurt y Turner, 1984; Shigenaga *et al.*, 1986c) así como el registro electrofisiológico de la actividad neuronal en el núcleo interpolar tras la estimulación pulpar (Azerad *et al.*, 1982; Pertovaara *et al.*, 1987b; Lucier y Egizii, 1989; Clarke y Matthews, 1990) han puesto de manifiesto la existencia de proyecciones de aferentes pulpares a dicho núcleo. Estas fibras aferentes pulpares son capaces de activar neuronas de las zonas medial y dorsal del núcleo así como de su borde ventromedial (Hayashi *et al.*, 1984). Las aferentes pulpares no tienen porqué tener funciones exclusivamente nociceptivas (Dubner *et al.*, 1978; Hu *et al.*, 1981), sin embargo su relación principalmente con este tipo de sensibilidad soporta la idea de la posible implicación del núcleo interpolar en mecanismos nociceptivos trigeminales.

Estudios inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto que el núcleo interpolar recibe aferentes primarias que expresan CGRP, en su mayoría de origen trigeminal (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Boissonade *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). Según estos autores, dicha inmunorreactividad de CGRP es más manifiesta en la mitad caudal del núcleo interpolar, región que presenta muchas proyecciones al complejo ventrobasal del tálamo (Bruce *et al.*, 1987), que en la mitad rostral, la cual se caracteriza por tener muy pocas o ninguna proyección a dicho complejo talámico (Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Erzurumlu y Killackey, 1980; Shigenaga *et al.*, 1983, 1986c). Concretamente, en la zona caudal del núcleo interpolar se ha observado inmunorreactividad de CGRP en posiciones ventrolateral, medioventral y dorsomedial, mientras que en la región rostral ésta se concentra fundamentalmente en posición ventrolateral, siendo escasa en la porción dorsal (Henry *et al.*, 1996).

La estimulación mecánica y química (aceite de mostaza) nocivas de regiones trigeminales (excluyendo la pulpa dentaria) (Anton *et al.*, 1991; Sugimoto *et al.*, 1998a), la estimulación eléctrica del ganglio de Gasser (Takemura *et al.*, 2000a) o de los nervios periféricos que inervan regiones orofaciales (Sugimoto *et al.*, 1998a) y la estimulación eléctrica y química dentaria nocivas (Allen *et al.*, 1996) inducen inmunorreactividad de c-fos en neuronas de la subdivisión dorsomedial del núcleo interpolar bilateralmente, pero con predominio ipsilateral. Por el contrario, la estimulación mecánica y térmica dentarias nocivas se ha visto que no induce expresión de c-fos en neuronas del núcleo interpolar (Sugimoto *et al.*, 1998b; Chattipakorn *et al.*, 2005). Esta distribución de

neuronas con inmunorreactividad de c-fos en el núcleo interpolar coincide con el territorio de proyección central de neuronas aferentes primarias de pequeño diámetro que contienen sustancia P (Boissonade *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1997a). Igualmente, la localización de la expresión de c-fos se solapa con el lugar de terminación de aferentes primarias trigeminales que inervan estructuras intra y periorales (Shigenaga *et al.*, 1986a,b,c; Takemura *et al.*, 1987, 1991, 1993). Estas observaciones en conjunto avalan la idea de que el núcleo interpolar media la transmisión de información nociceptiva de la región oral.

El núcleo interpolar presenta los tres tipos básicos de neuronas identificadas, en función del grado de respuesta a estímulos cutáneos naturales, en los núcleos caudal (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hu y Sessle, 1984) y oral (Azerad *et al.*, 1982; Dallel *et al.*, 1990): neuronas mecanosensitivas de umbral bajo, neuronas de límite vasto y dinámico y, neuronas nociceptivas específicas o neuronas convergentes de umbral alto (Wall y Taub, 1962; Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984; Young y Perryman, 1986; Lucier y Egizii, 1989; Capra *et al.*, 1994; Ro y Capra, 1999). Las **neuronas mecanosensitivas de umbral bajo** constituyen el principal tipo de neuronas del núcleo interpolar (aproximadamente el 80%), se localizan en toda la extensión del núcleo y presentan las mismas características en cuanto a campos receptivos (pequeños, con límites bien definidos) y entradas aferentes (fibras A β) que las del núcleo caudal (Mosso y Kruger, 1973; Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hu y Sessle, 1984). Las **neuronas nociceptivas** tienen unos campos receptivos periféricos mayores que los de las neuronas mecanosensitivas de umbral bajo y se localizan en zonas restringidas del núcleo interpolar sin que existan diferencias a lo largo del eje rostrocaudal. Concretamente, estas neuronas se sitúan en la zona marginal lateral del núcleo interpolar, medialmente al tracto espinal del trigémino, y cerca o fuera del borde ventromedial del núcleo interpolar, adyacente a la formación reticular. Las neuronas nociceptivas específicas presentan una latencia de descarga más prolongada tras la estimulación eléctrica cutánea y/o mucosa orofacial que los otros dos tipos de neuronas. Este tipo de latencia es indicativa de la ausencia de entradas aferentes A β , de la misma forma que ha sido visto en el núcleo caudal del gato (Hu *et al.*, 1981) y del mono (Price *et al.*, 1976). Las neuronas nociceptivas, al igual que las neuronas mecanosensitivas de umbral bajo, presentan unas características similares a las de las neuronas nociceptivas del núcleo caudal (Gordon *et al.*, 1961; Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984), que son: i) la proporción similar de neuronas nociceptivas

presentes en ambos núcleos (25% y 20% en los núcleos caudal e interpolar, respectivamente); ii) la extensión del campo receptivo, el 50% y el 70% de las neuronas nociceptivas de los núcleos caudal e interpolar, respectivamente, presentan un campo receptivo mayor de 100 mm²; iii) la localización, que en ambos casos se sitúan en regiones superficiales y profundas del núcleo. Sin embargo, existen dos características que contribuyen a diferenciar las neuronas nociceptivas de estas dos divisiones del núcleo espinal trigeminal. Por una parte, algunas neuronas de límite vasto y dinámico del núcleo interpolar presentan un campo receptivo con una zona periférica que sólo responde a estímulos táctiles (Hayashi *et al.*, 1984), mientras que en el núcleo caudal estas neuronas únicamente podían ser activadas por estímulos nocivos o bien estímulos nocivos e ino cuos (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Yokota *et al.*, 1981; Dubner y Bennett, 1983). Por otra parte, no existe ninguna evidencia de que neuronas nociceptivas del núcleo interpolar puedan ser activadas por entradas aferentes de fibras C (Hayashi *et al.*, 1984), a diferencia de lo que se ha observado en el núcleo caudal (Mosso y Kruger, 1973; Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984).

La mayoría de las neuronas del núcleo interpolar tienen su campo receptivo en la división maxilar del nervio trigémino (p. ej. el 70% de las neuronas mecanosensitivas de umbral bajo), sin embargo, de la misma forma que se ha observado en las otras divisiones del núcleo espinal trigeminal, estas neuronas están topográficamente organizadas (Kruger *et al.*, 1961; Kruger y Michel, 1962a; Wall y Taub, 1962; Kerr *et al.*, 1968; Woolston *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984; Jacquín *et al.*, 1986b; Ro y Capra, 1999), a diferencia de lo que sugirieran Darian-Smith (1966) y Azerad *et al.* (1982). Las neuronas que presentan un campo receptivo intraoral se sitúan medialmente en el núcleo interpolar, mientras que las que lo tienen en regiones faciales periféricas se localizan lateralmente en el núcleo interpolar. De la misma forma, los campos receptivos mandibulares son representados dorsomedialmente en el núcleo interpolar, las neuronas con campos receptivos oftálmicos son restringidas a la región ventrolateral del núcleo interpolar, y las neuronas con campos receptivos maxilares se sitúan en medio de las dos anteriores. Darian-Smith (1966) no halló esta organización somatotópica porque observó que la mayoría de las neuronas del núcleo interpolar tenían campos receptivos grandes. Una posible explicación a esta controversia puede haber sido que este autor incluyera un gran número de neuronas de la formación reticular en la población neuronal de estudio, las cuales normalmente presentan extensos campos receptivos (Gordon *et al.*, 1961; Nord, 1967; Sessle y Greenwood, 1976; Dubner *et al.*, 1978;

Hayashi *et al.*, 1984). Sin embargo, también podría deberse a la existencia de una proporción significativamente menor de neuronas no nociceptivas que de neuronas nociceptivas en la muestra neuronal, ya que es sabido que éstas últimas presentan campos receptivos de mayores dimensiones que las primeras (Hayashi *et al.*, 1984).

Las neuronas del núcleo interpolar, tanto nociceptivas como no nociceptivas, proyectan al complejo ventrobasal del tálamo contralateral, al cerebelo ipsilateral y al asta ventral de la médula espinal cervical ipsilateral (Darian-Smith, 1966; Karamanlidis, 1968; Burton y Loewy, 1977; Steindler, 1977; Watson y Switzer, 1978; Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Ikeda, 1979; Somana *et al.*, 1980; Ruggiero *et al.*, 1981; Sumino *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Matsushita *et al.*, 1982; Woolston *et al.*, 1982). Estas neuronas no presentan diferencias en cuanto a propiedades del campo periférico en función del lugar de proyección, aunque la mayoría de las neuronas con proyección talámica y cerebelosa son neuronas mecanosensitivas de umbral bajo (Hayashi *et al.*, 1984). En contraste con las observaciones del estudio de Ohya *et al.* (1993), se ha observado que la velocidad de conducción de los axones de neuronas nociceptivas del núcleo interpolar que proyectan al tálamo así como al cerebelo, pero no a la médula espinal, es significativamente menor que la de los axones de neuronas mecanosensitivas de umbral bajo (Hayashi *et al.*, 1984). Estos hallazgos confirman que las neuronas que reciben entradas aferentes primarias de diámetro más pequeño y con menor velocidad de conducción, también tienen axones que conducen más lentamente (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981). Hayashi *et al.* (1984) han sugerido que las neuronas del núcleo interpolar que proyectan a la médula espinal, al igual que se ha visto en otras divisiones del núcleo espinal del trigémino (Abrahams y Richmond, 1977; Sumino *et al.*, 1981), ejercen efectos excitatorios e inhibitorios en motoneuronas de la médula espinal cervical implicadas en movimientos involuntarios del cuello. Por el contrario, las neuronas que proyectan al cerebelo están implicadas en el control motor, mientras que las neuronas nociceptivas con proyección talámica contribuyen a la sensibilidad dolorosa orofacial que persiste tras la tractotomía trigeminal (p. ej. Vyklicky *et al.*, 1977; Young *et al.*, 1981).

La mayoría de los estudios realizados en el núcleo interpolar han sido llevados a cabo considerando entradas aferentes desde la región cutánea facial y pulpar (p. ej. Darian-Smith, 1966; Somana *et al.*, 1980; Westrum *et al.*, 1980; Arvidsson y Gobel, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984; Marfurt y Turner, 1984; Hayashi, 1985b; Shigenaga *et al.*, 1986c; Pertovaara *et al.*, 1987b; Jacquin *et al.*, 1989; Lucier y

Egizii, 1989; Clarke y Matthews, 1990). Sin embargo, algunas investigaciones se han centrado en el estudio de las respuestas neuronales del núcleo interpolar a entradas procedentes de estructuras orales profundas así como en el análisis de los modelos de convergencia de aferentes profundas y superficiales en esta división del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Hayashi *et al.*, 1984; Ohya, 1992; Ohya *et al.*, 1993; Capra *et al.*, 1994; Ro y Capra, 1999).

Las neuronas del núcleo interpolar, de la misma forma que las neuronas del núcleo caudal (Kojima, 1990), han sido agrupadas en tres categorías atendiendo a su activación por estímulos naturales aplicados en estructuras orales profundas, tales como ATM o músculo masetero (Ohya, 1992; Ohya *et al.*, 1993): neuronas de clase I, aquellas que sólo responden a estimulación inocua; neuronas de clase II, las que sólo son activadas por estimulación nociva; y neuronas de clase III, aquellas que son excitadas tanto por estimulación nociva como inocua. Esta clasificación no presenta una correspondencia con aquella realizada en base a la estimulación de regiones cutáneas en ninguno de los núcleos del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Sessle y Greenwood, 1976; Kojima, 1990; Ohya, 1992). Es decir, las neuronas de clase I, II y III no son equiparables funcionalmente a las neuronas mecanosensitivas de umbral bajo, neuronas nociceptivas específicas y neuronas de límite vasto y dinámico, respectivamente. Así, por ejemplo, se ha visto que neuronas del núcleo interpolar de clase I pueden ser excitadas por estimulación nociva de la región facial cutánea, de la misma forma que neuronas de clase II pueden ser activadas por estimulación inocua cutánea (Ohya, 1992). Esta convergencia de información desde la piel y estructuras profundas, un hallazgo ampliamente documentado para neuronas del asta dorsal de la médula espinal y del núcleo caudal (Hu *et al.*, 1981; Craig y Kniffki, 1985; Amano *et al.*, 1986; Sessle *et al.*, 1986; Broton *et al.*, 1988; Hoheisel y Mense, 1989, 1990; Hu, 1990; Hu *et al.*, 1992), contribuye al mecanismo de dolor referido o difuso en regiones orofaciales, el cual es una característica del dolor somático profundo.

Las neuronas nociceptivas (clases II y III) y no nociceptivas (clase I) que responden a la estimulación de la ATM y/o del músculo masetero se localizan, todas ellas, en la región dorsomedial del núcleo interpolar así como en su borde medial, adyacente a la formación reticular (Ohya, 1992; Ohya *et al.*, 1993). La distribución de estas neuronas en el núcleo interpolar es consistente con el hallazgo de que el nervio mandibular, que inerva la ATM y el músculo masetero, proyecta a la región dorsomedial de dicho núcleo (Hayashi *et al.*, 1984; Jacquin *et al.*, 1986b).

Las neuronas que reciben fibras aferentes profundas, como las que reciben entradas cutáneas (Karamanlidis, 1968; Steindler, 1977; Watson y Switzer, 1978; Burton y Craig, 1979; Fukushima y Kerr, 1979; Ikeda, 1979; Somana *et al.*, 1980; Azerad *et al.*, 1982; Matsushita *et al.*, 1982; Woolston *et al.*, 1982), poseen proyecciones al tálamo contralateral, concretamente al núcleo talámico ventral posteromedial y al cerebelo ipsilateral, especialmente a la parte posteromedial de la “crus II” del córtex cerebeloso (Ohya *et al.*, 1993). Ambos tipos de neuronas de proyección no presentan diferencias en cuanto a características fisiológicas, siendo el 42% y el 63% de las neuronas que proyectan al tálamo y al cerebelo, respectivamente, neuronas nociceptivas (Ohya *et al.*, 1993). El núcleo interpolar del trigémino interviene en los mecanismos relacionados con el procesamiento de las sensaciones de la región orofacial profunda, incluida la de naturaleza nociceptiva. Así, neuronas del núcleo interpolar que reciben entradas profundas proyectan al núcleo talámico ventral posteromedial, un centro esencial en la transmisión de información aferente, incluida la de naturaleza dolorosa, al área somatosensorial del córtex cerebral (Welker, 1971; Donaldson *et al.*, 1975; Saporta y Kruger, 1977). Además, fibras aferentes musculares principalmente de pequeño calibre mielinizadas (grupo III o fibras A δ), las cuales median el dolor muscular (Painral, 1960; Kumazawa y Mizumura, 1977; Mense, 1977; Foreman *et al.*, 1979), proyectan a neuronas del núcleo interpolar. Por otra parte, células del núcleo interpolar responden a la inyección intramuscular de solución salina hipertónica, un irritante químico el cual es sabido que induce dolor en humanos (Jensen y Norup, 1996; Graven-Nielson *et al.*, 1997; Svensson *et al.*, 1997), así como a la estimulación mecánica nociva de estructuras profundas (Nishimori *et al.*, 1986; Ohya, 1992; Ro y Capra, 1999).

La mayoría de las neuronas del núcleo interpolar son excitadas únicamente por estímulos inocuos aplicados a la región facial cutánea (Wall y Taub, 1962; Hu *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984). Sin embargo, aproximadamente el 70% de las neuronas del núcleo interpolar responden a estimulación nociva de la ATM y/o masetero (Ohya, 1992), porcentaje similar al registrado por Kojima (1990) en el núcleo caudal (62%). Esta diferencia puede ser explicada por la convergencia de entradas aferentes cutáneas de bajo umbral y entradas aferentes musculares de alto umbral en neuronas del núcleo interpolar. En este sentido, se ha observado que aferentes musculares de alto umbral convergen en neuronas no nociceptivas del núcleo interpolar (Hayashi *et al.*, 1984), así como en neuronas no nociceptivas de otros núcleos del

complejo nuclear sensitivo del trigémino (Sessle y Greenwood, 1976; Amano *et al.*, 1982).

c) Núcleo sensitivo principal

El núcleo principal se considera un centro fundamentalmente responsable de la transmisión de la información no nociceptiva (Wall y Taub, 1962; Dubner *et al.*, 1978; Azerad *et al.*, 1982). Sin embargo, de la misma forma que se ha visto para las distintas divisiones del núcleo espinal del trigémino (p. ej. Sjöqvist, 1938; Nord y Young, 1975; Boissonade *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1984; Hayashi, 1985b; Broton y Rosenfeld, 1986; Dallel *et al.*, 1990; Strassman y Vos, 1993), existe alguna evidencia de que el núcleo principal también podría participar en los mecanismos implicados en la sensibilidad nociceptiva orofacial (Sessle y Greenwood, 1976; Batten *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Liang y Terashima, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a; Takemura *et al.*, 2000a).

Estudios electrofisiológicos y de proyección empleando HRP como trazador, han identificado neuronas del núcleo principal que reciben entradas pulpares (Arvidsson y Gobel, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Marfurt y Turner, 1984; Shigenaga *et al.*, 1986c; Clarke y Matthews, 1990) así como aferentes primarias mecanonociceptivas orofaciales A δ (Liang y Terashima, 1993), de la misma forma que, también mediante registro electrofisiológico, se ha visto que neuronas del núcleo principal responden a estimulación pulpar así como a estimulación térmica o mecánica nocivas cutáneas, algunas de las cuales proyectan al complejo ventrobasal talámico contralateral (Nord, 1976; Sessle y Greenwood, 1976; Woda *et al.*, 1977; Azerad *et al.*, 1982; Young y Perryman, 1986), región ampliamente conocida por ser lugar de proyección de aferentes nociceptivas (Guilbaud *et al.*, 1980; Honda *et al.*, 1983; Yokota y Matsumoto, 1983a, 1983b).

A diferencia de lo que se ha visto en el núcleo espinal del trigémino, en el núcleo principal de ratas y hurones no se ha detectado expresión de c-fos ni posteriormente a la estimulación mecánica (Sugimoto *et al.*, 1998a,b), eléctrica (Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2005), química (Anton *et al.*, 1991; Chattipakorn *et al.*, 2005) o térmica (Chattipakorn *et al.*, 2005) nocivas de regiones orofaciales, incluyendo la pulpa dentaria, ni tras la estimulación eléctrica de nervios periféricos que inervan dichas

regiones (Sugimoto *et al.*, 1998a). Por el contrario, sí se ha registrado inmunorreactividad de c-fos tras la estimulación eléctrica del ganglio de Gasser, la cual tiende a concentrarse en la división dorsal del núcleo principal (Takemura *et al.*, 2000a), siendo ésta el principal campo de terminación de aferentes primarias trigeminales que inervan estructuras intra y periorales (Shigenaga *et al.*, 1986a,b,c; Takemura *et al.*, 1987, 1991, 1993), lo que apoya la participación del núcleo principal en la transmisión de la información nociceptiva de la región oral.

Estudios inmunohistoquímicos han identificado neuronas aferentes CGRP inmunorreactivas que proyectan al núcleo principal ipsilateral (Batten *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a), concentrándose la terminación de dichas fibras fundamentalmente en la subdivisión dorsomedial (Batten *et al.*, 1988; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). En la rata (Skofitsch y Jacobowitz, 1985a; Kruger *et al.*, 1988a,b; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992), en el gato (Batten *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1996) y en el hombre (Unger y Lange, 1991; Quartu *et al.*, 1992a,b) se han llevado a cabo investigaciones acerca de la distribución de fibras CGRP inmunorreactivas en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y pese a que se han visto algunas diferencias entre especies en el modelo de distribución de dichas fibras dentro del mismo, en general es bastante similar. La diferencia más sobresaliente hace referencia a una mayor proyección de fibras CGRP inmunorreactivas al núcleo principal que al núcleo oral de gatos (Batten *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1996), al contrario de lo que se observa en ratas, donde la proporción es a la inversa (Batten *et al.*, 1988; Kruger *et al.*, 1988a,b; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992). Esta diferencia interespecies junto con el hecho de que el núcleo principal, pero no el núcleo oral, de gatos presente numerosas neuronas que proyectan al núcleo ventral posteromedial del tálamo contralateral (Shigenaga *et al.*, 1983, 1986c) ponen de manifiesto que esta división del complejo nuclear sensitivo del trigémino en el gato pueda ser un centro más implicado en la transmisión y/o modulación de la información nociceptiva intraoral.

1.4. Médula espinal cervical

La médula espinal es la parte del sistema nervioso central que se encuentra alojada en el conducto vertebral o conducto raquídeo. Tiene una consistencia blanda y pastosa, aunque algo más firme que la del encéfalo, y en los Mamíferos adultos presenta una longitud inferior a la de la columna vertebral (Kappers *et al.*, 1936). Precisamente por tener esta consistencia y por gozar de una situación central dentro del conducto vertebral recibió en la antigüedad el nombre de médula, pues fue comparada con la médula ósea que ocupa el conducto diafisario de los huesos largos.

El diámetro transversal de la médula espinal siempre es ligeramente mayor que su diámetro anteroposterior, lo que le confiere un aspecto aplastado de delante hacia atrás. Sin embargo, su diámetro no es uniforme, puesto que se engruesa en los segmentos correspondientes a las emergencias de los nervios espinales destinados a inervar las extremidades. Así, generalmente, en la médula se identifica un engrosamiento o intumescencia cervical y otra lumbar, estando el tamaño de ambas condicionadas por el grado de desarrollo de los miembros superior e inferior, respectivamente. En este sentido, debe ser señalado que estas intumescencias medulares no están presentes en los animales no tetrápodos, como los ofidios; y son de tamaño muy reducido en los animales que poseen miembros rudimentarios, como la foca (Kuhlenbeck, 1975).

La médula espinal no presenta en su superficie exterior indicio alguno de la oscura segmentación que la divide en tantos mielómeros como pares raquídeos. El número de mielómeros está sujeto a variaciones entre las distintas especies y está directamente relacionado con el número de vértebras de las regiones cervical, torácica, lumbar, sacra y coccígea. En general, en los Mamíferos existen 7 vértebras y 8 mielómeros cervicales, pues el primer par de nervios raquídeos se sitúa entre el hueso occipital y el atlas (Rexed, 1952; Zeman e Innes, 1963). A diferencia de la médula cervical, esta uniformidad en la segmentación entre las distintas especies no se observa en las demás regiones, donde puede haber notables variaciones numéricas (Anthony, 1972). Así por ejemplo, frente a los 3 mielómeros coccígeos presentes en la rata (Hebel y Stromberg, 1986), se hallan los 7-8 mielómeros coccígeos del gato (Rexed, 1952) y los 8 mielómeros coccígeos de las ballenas (Seki, 1958).

La médula espinal se continúa por su extremo craneal con el bulbo raquídeo, siendo difícil establecer un límite preciso entre ambos. Aunque el comienzo de la médula espinal suele situarse a la altura de la entrada del primer nervio espinal dorsal (Rexed, 1952), prácticamente a nivel del *foramen magnum* en la rata (Zeman e Innes, 1963), algunos autores no son capaces de aislar las raíces dorsales asociadas al segmento C1, de modo que consideran que el primer segmento cervical comienza en el final de la decusación de las pirámides, que proyectado sobre el esqueleto corresponde a un plano horizontal que pasa por las articulaciones occipito-atloideas (Molander *et al.*, 1989).

1.4.1. Organización del asta dorsal

Atendiendo a su configuración interior, en la médula espinal se identifica una porción central con aspecto parecido a una H o de mariposa con las alas extendidas, que es la sustancia gris, y la cual está constituida a cada lado por una masa en forma de coma, con la cabeza orientada hacia delante y la concavidad hacia fuera, unidas ambas por sus convexidades mediante la comisura gris; y entorno a ésta, constituyendo una cáscara periférica, se halla la sustancia blanca. Las cuatro ramas verticales de sustancia gris que se sitúan anterior y posteriormente a la comisura gris (dos anteriores y dos posteriores) conforman las denominadas astas ventrales y dorsales, respectivamente, de la médula espinal, emergiendo de las primeras las raíces anteriores o motoras y de las segundas las raíces posteriores o sensitivas de los distintos nervios espinales. Por tanto, atendiendo a una perspectiva simplista se podría decir que el asta anterior es motora, mientras que la posterior es sensitiva.

Los diferentes tipos neuronales que conforman la sustancia gris de la médula espinal se organizan en núcleos más o menos continuos a lo largo de toda su extensión. A pesar de que la existencia de estos núcleos tiene implicaciones funcionales y los neuroanatomistas clásicos describían la organización de la sustancia gris en razón de éstos (Waldeyer, 1888; Cajal, 1909), su sistematización es poco precisa y ha sido objeto de diferentes interpretaciones (Brown, 1981). Unos autores han prestado atención al tamaño neuronal y al aspecto del núcleo, mientras que otros han considerado su localización y función. Igualmente, hasta hace pocos años no era infrecuente encontrarse literatura que se refiriese al asta dorsal como integrada por un vértice, una

cabeza, un cuello y una base; y al asta ventral como constituida por una cabeza y una base. En ambos casos, términos muy genéricos para referirse a las distintas partes de la sustancia gris medular.

A pesar de que las primeras evidencias acerca de la existencia de una disposición en capas o laminar de la sustancia gris se constata en el primer cuarto del siglo pasado (Cajal, 1909; Obersteiner, 1912; Hirasawa, 1925), tuvieron que pasar otros 25 años más para que Rexed (1952) identificase, en secciones de la médula espinal del gato teñidas para los grumos de Nissl y siguiendo un criterio puramente citoarquitectónico, las 10 láminas que se sabe hoy en día que constituyen la sustancia gris espinal de diversas especies animales, entre las que se incluyen la rata (Brichta y Grant, 1985), el cobaya (Schröder, 1977), los Primates (Noback y Harting, 1971) y por supuesto, el hombre (Schoenen, 1973).

Teniendo en cuenta que las aferentes primarias trigeminales terminan a nivel del asta dorsal de la sustancia gris de la médula espinal cervical, a continuación únicamente nos centraremos en el estudio de las 5 primeras láminas, de las cuales serán descritas las características citoarquitectónicas y neuroquímicas, así como las conexiones de éstas con otros centros nerviosos.

a) Lámina I

La lámina I, también conocida como lámina marginal (Kappers *et al.*, 1936), fue definida por Rexed (1952) como una delgada capa celular que describe una curvatura y recubre a modo de velo la región dorsal del asta dorsal. Esta lámina es la más delgada de todas y se estrecha conforme se desplaza lateralmente.

La mayoría de las neuronas de la lámina I son de pequeño o mediano tamaño, aunque también se ha identificado un escaso número de células de gran tamaño que se han descrito típicamente como células marginales (Waldeyer, 1888). Atendiendo a criterios morfológicos y funcionales, múltiples han sido los investigadores que han descrito diversos tipos neuronales en la lámina I, y entre los que cabe citar a los siguientes.

Gobel (1978a), quien realizó sus estudios en el núcleo caudal del trigémino del gato, identificó dos tipos de *células piramidales*, uno espinoso y otro liso, este último con un árbol dendrítico que contiene menos espinas; y dos tipos de *células multipolares*,

uno con un árbol dendrítico denso y otro con un árbol dendrítico laxo. Según Gobel (1978a) el árbol dendrítico de los cuatro tipos de neuronas está confinado a la lámina I y al tracto sensitivo del trigémino, lo cual contrasta con las observaciones de Light *et al.* (1979), quienes afirmaron que únicamente el soma de estas células se localizaba en la lámina I mientras que el árbol dendrítico se expandía hacia la lámina II. Años más tarde, **Beal *et al.* (1981)** distinguieron en la lámina marginal de la médula espinal lumbosacra, teniendo en cuenta el tamaño y la forma del soma, la configuración dendrítica, la distribución y la especialización, 7 categorías neuronales: I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA y IVB, observando que existía una importante correlación entre sus diversos tipos celulares y los descritos por Gobel (1978a), pese a identificar una mayor diversidad celular que la registrada por este último investigador. En este sentido, cabe señalar que las células multipolares laxas se correspondían con algunas neuronas multipolares del grupo I, las multipolares compactas con otras representadas en el grupo IIIB y las células piramidales con distintos grupos. Sin embargo, no encontraron en la clasificación de Gobel (1978a) correlación alguna para los grupos IIB, IIIA y IV. Finalmente, **Lima y Coimbra (1983, 1986, 1990)** hallaron en la lámina I tres tipos de neuronas: *células de tipo A*, de soma redondeado y con dendritas siguiendo una dirección rostrocaudal muy acusada; *células de tipo B*, multipolares de soma triangular y con arborización dendrítica rostrocaudal, aunque también siguiendo otras direcciones y; *células de tipo C*, de soma ovoideo, aplastado dorsoventralmente y con arborización dendrítica en dirección rostrocaudal y lateroventral, pero nunca dorsoventral.

Atendiendo a criterios funcionales, **Light *et al.* (1979)**, por una parte, identificaron en la zona marginal y en la sustancia gelatinosa del asta dorsal espinal tres categorías de neuronas: mecanorreceptoras, nociceptivas y termorreceptoras, localizándose las primeras principalmente en la lámina II interna (IIi) y las otras dos preferentemente en las láminas I y II externa (IIo); mientras que **Réthelyi *et al.* (1989a)**, por otra parte, además de reconocer en el asta dorsal espinal superficial las dos formas principales de células identificadas por Cajal (1909): centrales (o insulares) y limítrofes (o pedunculadas), describieron en esta misma zona cuatro categorías funcionales de neuronas: nociceptivas específicas, mecanorreceptoras específicas, térmicas específicas y multirreceptoras (de límite vasto y dinámico).

En la lámina I se ha identificado, mediante el transporte transganglionar de la peroxidasa de rábano (HRP) aplicada en nervios periféricos previamente seccionados, la terminación de aferentes primarias cutáneas (Arvidsson y Pfaller, 1990), viscerales

(Cervero, 1989) y propioceptivas (Shigenaga *et al.*, 1988b). Igualmente, la aplicación de este enzima en las mismas raíces dorsales, difundiendo ésta hacia el trayecto central de los axones que habían sido seccionados (Light y Perl, 1979a; Matsushita y Tanami, 1983), ha permitido confirmar la presencia de proyecciones contralaterales hacia la lámina I.

Al margen de lo mencionado en el párrafo precedente, resulta de mayor interés saber qué tipo de fibras terminan en la lámina I, puesto que de ello se deriva el papel fisiológico que desempeña cada lámina. Ya a principios del siglo XX se mencionó que la lámina I recibía la proyección de fibras de pequeño diámetro (Ranson, 1913; Ranson y Billingsley, 1916), concretándose posteriormente mediante estudios con la HRP (Gobel *et al.*, 1981a; Cruz *et al.*, 1987) que en la lámina marginal se arborizan terminales amielínicas de tipo C y mielínicas de tipo A δ . Igualmente, pero atendiendo a criterios fisiológicos, cabe destacar la investigación llevada a cabo por Christensen y Perl (1970), quienes describieron tres tipos neurofisiológicos de células en la lámina I que respondían a: i) estímulos mecánicos nocivos que llegan por medio de fibras A δ ; ii) estímulos mecánicos y térmicos nociceptivos transportados por fibras de tipo C y A δ ; iii) estímulos mecánicos y térmicos nociceptivos y térmicos inocuos vía fibras C y A δ . Actualmente, mediante los estudios realizados en los últimos años, la mayoría de los autores (Willis, 1988; Cervero, 1989) reconocen dos tipos de células en la lámina marginal: neuronas nociceptivas específicas, que únicamente responden a estímulos dañinos y; neuronas de límite vasto y dinámico, que reciben impulsos aferentes de fibras de diversos diámetros y recogen estímulos mecánicos inocuos (táctiles) y nociceptivos.

En la lámina I se han hallado fibras y terminaciones nerviosas con inmunorreactividad para diversos neuropéptidos, de los cuales, los que más nos interesan en el presente trabajo son el CGRP y la sustancia P, siendo además los más abundantes en esta lámina.

Las investigaciones efectuadas en la rata (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Herdegen *et al.*, 1994), el gato (Arvidsson *et al.*, 1990), el mono (Carlton *et al.*, 1988), el hombre (Gibson *et al.*, 1984), y otras especies (Merighi *et al.*, 1990), resaltan la masiva presencia de fibras que contienen **CGRP** en las láminas I y II. Tanto los estudios donde se ha realizado una rizotomía de las raíces dorsales (Chung *et al.*, 1988) como aquellos en los que se ha efectuado un tratamiento neonatal con capsaicina

(Franco-Cereceda *et al.*, 1987) revelan que la gran mayoría de las fibras con inmunoreactividad de CGRP que terminan en la lámina I son aferentes primarias de tipo C o A δ . La distribución de la **sustancia P** en el asta dorsal de la médula espinal es muy similar a la del CGRP. Las investigaciones llevadas a cabo en la rata (Seybold y Elde, 1980; Herdegen *et al.*, 1994), en el gato (Ichiyama *et al.*, 1997), en el mono (DiFiglia *et al.*, 1982) y en el hombre (Cuello *et al.*, 1976) confirman la abundancia de terminales que contienen sustancia P en las láminas I y II. Además, se ha visto que la rizotomía de las raíces dorsales espinales induce una importante disminución de la sustancia P en la lámina I (Knyihár-Csillik *et al.*, 1990), y que la administración neonatal de capsaicina produce una notable o casi total abolición de la cantidad de este neuropéptido presente en la lámina marginal, sugiriendo esta última práctica que las fibras que terminan en dicha capa son en su mayoría amielínicas (Nagy y Hunt, 1983). Sin embargo, no puede descartarse la presencia de fibras A δ , puesto que un 40% de estas fibras también son sensibles a la capsaicina (Nagy y Hunt, 1983). Por otra parte, se ha observado que el principal receptor para la sustancia P (receptor neuroquinina 1) está presente en prácticamente toda la superficie somática y dendrítica de las células fusiformes de gran tamaño de la lámina I, las cuales principalmente reciben entradas de tipo C (Brown *et al.*, 1995; Cheunsuang *et al.*, 2002), hecho que contribuye a fortalecer la implicación de la lámina más dorsal de la médula espinal en la transmisión de la información nociceptiva.

Desde los estudios de Gobel (1978a) y Brown (1981) se ha sugerido que gran parte de las neuronas de la lámina I presentan un axón que proyecta lejos del soma de origen, formando parte de las vías de segundo orden. En este sentido, investigaciones posteriores han identificado axones de células de la lámina I formando parte de los tractos espinotalámico (Apkarian y Hodge, 1989a), espinomesencefálico (Yeziarski, 1988), espinoreticular (Lima, 1990), espinohipotálamico (Li *et al.*, 1997), propiospinal descendente (Verburgh *et al.*, 1990) y espinocervical (Pubols y Haring, 1995). Igualmente se ha observado la proyección de neuronas de la lámina marginal a los núcleos de la columna dorsal (Verburgh *et al.*, 1990).

b) Lámina II

La lámina II de Rexed (1952) se corresponde con la sustancia gelatinosa de Rolando (1824) y es paralela a la lámina I, que la recubre dorsolateralmente, pero no en su borde medial. La lámina II está constituida por numerosas células de pequeño tamaño que oscilan entre 5-10 μm en el gato (Rexed, 1952) y 5-7 μm en la rata (Molander *et al.*, 1989), lo que conlleva que su aspecto al microscopio óptico a bajos aumentos sea más oscuro después de una tinción para grumos de Nissl, tal como han constatado numerosos investigadores (Rexed, 1952, 1954; Brown, 1981; Brichta y Grant, 1985; Molander *et al.*, 1989). En cambio, debido a la escasa presencia de fibras mielínicas, aparece más clara en tinciones específicas para dichas fibras (Brichta y Grant, 1985), de ahí el término clásico de sustancia gelatinosa.

La lámina II puede subdividirse, como ya sugiriera Cajal (1909) al situar sus células limítrofes en la porción externa de la sustancia gelatinosa y sus células centrales en la porción interna, en dos láminas: una externa (IIo o IIA) y otra interna (Ili o IIB) (Rexed, 1952). Igualmente estudios posteriores (Schröder, 1977; Beal y Cooper, 1978; Gobel *et al.*, 1981b; Beal, 1983) han confirmado la validez de esta subdivisión de la lámina II. En la capa externa existe una mayor población de pequeñas fibras mielinizadas, las células son más pequeñas y se disponen de manera menos laxa que en la capa interna, constituyendo su grosor 1/4 del total de la sustancia gelatinosa (Rexed, 1952).

Desde un punto de vista morfológico, la sustancia gelatinosa está constituida por diversos tipos celulares. Gobel (1978b) en su estudio a nivel del núcleo caudal del gato, identificó cuatro tipos de neuronas en la sustancia gelatinosa: células pedunculadas, células insulares, células arborescentes y células delimitantes entre las láminas II y III. Las *células pedunculadas* se corresponden con las células limítrofes de Cajal (1909), son las más abundantes y su soma se localiza habitualmente en la lámina IIo. Su árbol dendrítico se extiende medialmente a través de las láminas II y III, alcanzando a veces la lámina IV. En cambio, el axón habitualmente se dirige hacia la lámina I, donde se ramifica profusamente. Las *células insulares*, que probablemente se corresponden con las células centrales de Cajal (1909), se disponen en pequeños grupos y presentan su soma predominantemente en la lámina Ili (Bicknell y Beal, 1981). Sus dendritas y axones, a diferencia de las células pedunculadas, están confinados a la lámina II. Las

células insulares ya fueron descritas por Gobel (1975a,b) como neuronas de tipo II de Golgi, de pequeño tamaño y de soma triangular o fusiforme. Las *células arborescentes* tienen sus somas localizados en la lámina II, mientras que sus arborizaciones dendríticas alcanzan las láminas I y III y sus axones tras ramificarse terminan cerca de su árbol dendrítico. Las *células delimitantes entre las láminas II y III*, las cuales son las menos frecuentes, presentan su soma en la lámina II o en el límite de las láminas II y III y fueron denominadas células espinosas por Brown (1981) por ser las que poseen un mayor número de espinas dendríticas. Sus arborizaciones dendríticas y axónicas permanecen en las láminas II y III, con pocas ramificaciones extendiéndose hacia la lámina I. Gobel (1978a,b) también consideró a las neuronas arborescentes y espinosas como tipo II de Golgi.

La proyección de aferentes primarias hacia la sustancia gelatinosa ha sido demostrada mediante el transporte anterógrado de aminoácidos radioactivos desde los ganglios dorsales sensitivos (Réthelyi *et al.*, 1979) y mediante la aplicación de HRP a las mismas raíces dorsales (Light y Perl, 1979a,b; Matsushita y Tanami, 1983). Sin embargo, el transporte transganglionar de la HRP ha puesto de manifiesto que estas proyecciones son de origen somático (Nyberg y Blomqvist, 1985; Liu y Hu, 1988), y no ha detectado la presencia de terminales en la lámina II procedentes de aferentes primarias viscerales (Cervero, 1989) y propioceptivas de los músculos (Shigenaga *et al.*, 1988a).

La subdivisión de la sustancia gelatinosa en una lámina Ilo y otra Ili, también es confirmada por la diferente naturaleza de las fibras primarias que proyectan hacia una u otra lámina. Algunos autores afirman que las láminas I y Ilo reciben fibras de tipo C y A δ , mientras que en la lámina Ili hay una preponderancia de las de tipo C (Brown, 1981). Igualmente, los estudios con microscopía electrónica también han demostrado diferencias entre las dos subláminas, reconociendo un tipo de glomérulo sináptico predominante en la lámina Ilo y otro en la Ili (Ralston y Ralston, 1979; Ribeiro-da-Silva y Coimbra, 1982). Estos datos sugieren el distinto papel funcional desempeñado por las dos subláminas y apoyan la hipótesis de que la capa externa recibe fibras que transmiten sensaciones nociceptivas y térmicas, mientras que en la Ili terminan aferentes primarias implicadas preferentemente en sensaciones mecánicas inocuas (Brown, 1981; Grant, 1985).

En la lámina II, al igual que en la lámina marginal, también se ha confirmado la presencia de CGRP y sustancia P. Algunos autores precisan que la mayor parte de las

fibras positivas para **CGRP** se hallan en las láminas I y IIo (Carlton *et al.*, 1988; Itoh y Tessler, 1990). En cuanto a la **sustancia P**, se ha señalado que las terminales con este neuropéptido se localizan fundamentalmente en la lámina marginal y en la parte más externa de la sustancia gelatinosa (Knyihár-Csillik *et al.*, 1990). Sin embargo, otros investigadores sostienen que estas terminales se extienden con igual intensidad en las dos láminas superficiales de Rexed (Kawata *et al.*, 1989), alcanzando incluso la lámina III (Marlier *et al.*, 1990). Por otra parte, en el cerdo y en el caballo, se ha descrito una mayor presencia de sustancia P en la lámina II que en la lámina marginal (Merighi *et al.*, 1990). Finalmente, y en línea con lo que se comentó en relación a la lámina I, algunas neuronas de la sustancia gelatinosa también expresan el receptor neuroquinina 1 (Dam *et al.*, 1990).

La mayoría de las neuronas de la sustancia gelatinosa, a diferencia de la lámina precedente, son células de axón corto, por lo que no desempeñan un papel significativo en las vías ascendentes de la médula espinal. Su participación en los tractos espinotalámico (Jones *et al.*, 1987), espinohipotalámico (Burstein *et al.*, 1990) y propiospinal descendente (Verburgh *et al.*, 1990) es más bien discreta y sólo parece tener un papel significativo en los tractos espinomesencefálico (Wiberg y Blomqvist, 1984) y espinorreticular (Lima, 1990).

c) Lámina III

La lámina III de Rexed (1952) se corresponde con la región más dorsal del núcleo propio, y forma parte de la cabeza del asta dorsal, que anatómicamente comprende las láminas I-IV. La lámina III se sitúa ventralmente y es paralela a la sustancia gelatinosa, siguiendo su misma curvatura y siendo normalmente más gruesa (Rexed, 1952). Medialmente está recubierta por la sustancia blanca y lateralmente por la lámina II (Rexed, 1952). La dificultad para delimitar la lámina III de las dos láminas con las que linda, ha conllevado que en algunos casos se le haya denominado lámina III a lo que actualmente se conoce como lámina IIi (Gobel, 1978b) o se haya incluido parte de la lámina III en la lámina IIi (Beal y Cooper, 1978). Sin embargo, el límite entre las láminas II y III puede ser determinado por la presencia en esta última de un mayor número de fibras mielínicas, que además no forman haces compactos como en las láminas IV y V (Molander y Grant, 1984; Brichta y Grant, 1985; Molander *et al.*, 1989).

Además, al menos en el cobaya, el estudio de la distribución de metales pesados mediante la técnica de Timm (Schröder, 1977), diferencia claramente la lámina II de la lámina III.

La lámina III contiene una menor densidad celular, un mayor número de neuronas de gran tamaño y una mayor diversidad celular atendiendo a su tamaño y árbol dendrítico (Rexed, 1952; Gobel *et al.*, 1981b; Molander y Grant, 1984) que la sustancia gelatinosa. **Maxwell (1985)** ha identificado una población neuronal heterogénea en la lámina III, la cual incluye neuronas de gran tamaño y pequeñas que se diferencian en dos grupos por su distinta arborización dendrítica. Por una parte, se encuentran las células pequeñas, que en su mayoría son interneuronas, y las cuales se arborizan en el plano rostrocaudal estando confinadas prácticamente en la lámina III. Por otra parte, se hallan las neuronas que orientan sus dendritas según el eje dorsoventral, las cuales no se restringen a la lámina de origen. Por otra parte, **Brown (1981)** reconoce en la lámina III una neuronas piramidales, cuyo árbol dendrítico orientado dorsoventralmente se extiende hasta las láminas I, IV y V. Igualmente **Brown (1981)** y **Maxwell *et al.* (1983)** demostraron que las neuronas de la lámina III que forman parte del tracto espinocervical, orientan su árbol dendrítico en sentido rostrocaudal, no alcanzado estas dendritas significativamente la lámina II, pero ramificándose un cierto número de ellas en la lámina IV. Finalmente, **Powell y Todd (1992)** observaron que las células de la lámina III eran generalmente de pequeño y mediano tamaño, identificándose sólo ocasionalmente neuronas de gran tamaño. Muchas de las células presentaban un árbol dendrítico orientado rostrocaudalmente dentro de la lámina III, extendiéndose en algún caso hasta la lámina IV o hasta la mitad ventral de la lámina II; mientras que el resto de las células presentaba arborizaciones dendríticas en el eje dorsoventral, las cuales podían alcanzar la mitad ventral de la lámina II, la lámina I e incluso la sustancia blanca dorsal.

El transporte anterógrado de aminoácidos (Réthelyi *et al.*, 1979) y la aplicación de HRP a las raíces dorsales (Matsushita y Tanami, 1983) han puesto de manifiesto la importante proyección de aferentes primarias que recibe la lámina III. Igualmente, el transporte transganglionar de trazadores cuando fueron aplicados a las ramas cutáneas (Nyberg y Blomqvist, 1985; Liu y Hu, 1988) o inyectados en los ganglios dorsales (Arvidsson y Pfaller, 1990), pero no a aferentes viscerales (Willis, 1986; Cervero, 1989) o propioceptivas (Shigenaga *et al.*, 1988a), demostraron una consistente proyección en dicha lámina.

En relación a la naturaleza de las aferentes primarias que alcanzan la lámina III, Light y Perl (1979a,b) han descrito que las fibras que proyectan a la lámina III son fibras de tipo mielínico de pequeño y mediano tamaño ($A\delta$ y $A\beta$), a pesar de que en el estudio neurofisiológico de Light *et al.* (1979) y los estudios de microscopía electrónica de Gobel *et al.* (1981a) y Ribeiro-da-Silva y Coimbra (1982) se confirió un mayor protagonismo a las fibras $A\delta$ encargadas de transmitir impulsos inocuos. Finalmente, la inyección intraaxonal de HRP en fibras mecanorreceptoras (Brown, 1981), demostró la terminación de aferentes primarias implicadas en la recepción de estímulos mecanorreceptivos no dañinos en la lámina III.

En la lámina III se produce una importante disminución de las aferentes sensitivas peptidérgicas procedentes de neuronas de los ganglios dorsales. Únicamente señalar que se ha descrito una débil presencia de fibras con sustancia P y CGRP (Merighi *et al.*, 1990), que contrasta con la presencia de un cierto número de neuronas que contienen CGRP (Conrath *et al.*, 1989) localizadas en esta lámina.

Las neuronas de la lámina III no constituyen una fracción importante de las neuronas que participan en las vías espinales. Las células de la lámina III apenas intervienen en los tractos espinotalámico (Willis *et al.*, 1979), espinomesencefálico (Wiberg y Blomqvist, 1984), espinohipotalámico (Burstein *et al.*, 1990) y espinorreticular (Lima, 1990); de la misma forma que su proyección propiospinal y hacia los núcleos de la columna dorsal es bastante discreta (Verburgh *et al.*, 1990). A diferencia de las dos láminas superficiales de Rexed, las neuronas de la lámina III forman parte importante del tracto espinocervical (Brown, 1981; Pubols y Haring, 1995).

d) Lámina IV

La lámina IV de Rexed (1952) forma la base de la cabeza del asta dorsal, comprendiendo la parte principal del núcleo propio, presenta un mayor grosor que las tres anteriores y carece de su característica curvatura (Rexed, 1952; Brichta y Grant, 1985; Molander *et al.*, 1989). En la rata, la lámina IV se estrecha a medida que se curva ventralmente a lo largo de su borde medial (Molander *et al.*, 1989), curvatura que no fue descrita por Rexed (1952, 1954) en el gato. La lámina IV en algunas porciones de la médula espinal y a diferencia de las láminas precedentes, llega a contactar con la lámina

IV contralateral en el plano medio (Rexed, 1952; Molander *et al.*, 1989). En este sentido, Rexed (1952) observó este hecho en el gato en los segmentos torácicos T4-T12, lumbares superiores y sacros inferiores y; Molander *et al.* (1989) lo registró en la rata en los niveles cervicales y en los primeros segmentos torácicos. Rexed (1952) mencionó la dificultad para separar la lámina IV de las dos láminas con las que linda, puesto que no existe una demarcación nítida entre ellas. Sin embargo, el mayor tamaño y heterogeneidad celular (Rexed, 1952; Brown, 1981), la disposición neuronal más laxa y el mayor diámetro de fibras mielínicas (Gobel *et al.*, 1981b) en la lámina IV que en la lámina III contribuyen a establecer esta distinción; de la misma forma que la apariencia reticular de la porción lateral de la lámina V constituye una demarcación entre las láminas IV y V.

Atendiendo a la morfología neuronal de las células de la lámina IV, Brown (1981) señaló que el árbol dendrítico de estas células tiende a disponerse dorsalmente. Sin embargo, las neuronas cuyos axones participan en el tracto espinocervical, y las cuales normalmente son las células de mayor tamaño (Brown, 1981), orientan su árbol dendrítico longitudinalmente, y rara vez alcanzan la sustancia gelatinosa (Brown, 1981). Igualmente, Brown (1981) describió neuronas de la lámina IV provistas de axones que ascendían en el funículo dorsolateral las cuales presentaban expansiones dendríticas que alcanzaban las láminas superficiales del asta dorsal. Molander *et al.* (1989) observaron, en la rata, que la mayor parte de las células de la lámina IV eran similares a las de la lámina III, pese a que también describieron en esta lámina neuronas multipolares de mayor tamaño.

La inyección de aminoácidos radiactivos en los ganglios dorsales sensitivos (Réthelyi *et al.*, 1979; Ralston y Ralston, 1982) y la aplicación de HRP en las raíces dorsales (Light y Perl, 1979a; Matsushita y Tanami, 1983) han confirmado los resultados obtenidos en estudios más clásicos realizados con los métodos de degeneración (Grant y Ygge, 1981), en los cuales se observó la presencia de aferentes primarias en la lámina IV. Análogamente a lo descrito en la lámina III, el transporte transganglionar de trazadores aplicados a las ramas cutáneas (Nyberg y Blomqvist, 1985; Liu y Hu, 1988) pero no a aferentes viscerales (Cervero, 1989) o propioceptivas (Shigenaga *et al.*, 1988a), demostraron una consistente terminación de aferentes primarias en dicha lámina.

Los estudios degenerativos de Ralston y Ralston (1982) confirmaron la presencia de fibras A β en la lámina IV, hallazgo que ya fuera descrito por Gobel *et al.*

(1981b), pero no detectaron una proyección consistente de fibras A δ e indicaron además que las fibras tipo C no establecían sinápsis con elementos celulares presentes en la lámina IV. Además, las investigaciones realizadas mediante inyecciones intraaxonales de fibras identificadas neurofisiológicamente, han demostrado que las aferentes primarias que proyectan a la lámina IV pertenecen a diversos mecanorreceptores, que responden a estímulos táctiles no dañinos (Brown, 1981).

La presencia de neuropéptidos en la lámina IV es, al igual que se comentó en la lámina III, poco representativa, por lo que resultaría superfluo enumerar un sinnúmero de trabajos en los que se muestra una escasa o nula presencia de CGRP o sustancia P.

La participación de las neuronas de la lámina IV en las vías nerviosas de segundo orden es mayor que la apreciada en las láminas II y III. Concretamente, existe un número muy superior de neuronas de la lámina IV que forman parte de la vía espinotalámica (Jones *et al.*, 1987). Igualmente, en esta lámina existe una importante población de neuronas que proyecta hacia las columnas dorsales (English *et al.*, 1985) así como otras que contribuyen a la vía propioespinal ascendente (English *et al.*, 1985) y descendente (Verburgh *et al.*, 1990) y a la vía espinocervical (Pubols y Haring, 1995). Por el contrario, pocas neuronas de la lámina IV forman parte de las vías espinomesencefálica (Wiberg y Blomqvist, 1984), espinoreticular (Shokunbi *et al.*, 1985) o espinohipotalámica (Burstein *et al.*, 1990).

e) Lámina V

La lámina V de Rexed (1952) se corresponde con el cuello del asta dorsal de la médula espinal (Steiner y Turner, 1972; Kuhlenbeck, 1975; Brichta y Grant, 1985; Molander *et al.*, 1989) y es relativamente más amplia dorsoventralmente en la rata que en el gato (Steiner y Turner, 1972; Molander *et al.*, 1989). Rexed (1952, 1964) subdividió esta lámina en dos porciones: una parte medial, que presenta una red de arborizaciones axonales y dendríticas más homogénea y neuronas de pequeño tamaño y; una parte lateral, que al estar atravesada por gruesos haces de fibras mielinizadas, presenta un aspecto reticulado y contiene neuronas dispuestas más laxamente y de tamaño heterogéneo, algunas de ellas más grandes que las neuronas de la lámina IV. La lámina V en los segmentos lumbares inferiores y sacros de la rata cruza el plano medio contactando con la lámina V contralateral (Steiner y Turner, 1972), sin embargo, este

contacto no se establece en los segmentos torácicos y lumbares superiores debido a la presencia del núcleo dorsal.

En la rata, los tamaños de los somas neuronales son similares a los observados en la lámina IV, excepto en que se detectan grandes neuronas, especialmente en la región lateral (Brichta y Grant, 1985). Ritz y Greenspan (1985) describieron la morfología de las neuronas de la lámina V, hallando diferencias en el tamaño y arborización dendrítica las cuales las relacionaron con sus distintos papeles funcionales. Las *neuronas multirreceptivas*, las cuales respondían a estímulos mecánicos inocuos y nociceptivos, presentaban somas de gran tamaño, poseían un árbol dendrítico orientado en todas las direcciones y un axón que ascendía por la sustancia blanca contralateral; las *neuronas nociceptivas específicas*, que únicamente eran activadas por estímulos dañinos, exhibían una arborización dendrítica similar a la de las neuronas multirreceptivas, pero el tamaño de sus somas era inferior; y las *neuronas no nociceptivas*, que eran excitadas únicamente por estímulos mecánicos inocuos, presentaban un árbol dendrítico más sencillo que las nociceptivas específicas y un soma de pequeño tamaño.

La aplicación de HRP a las raíces dorsales ha permitido visualizar una proyección consistente de aferentes primarias a la lámina V (Light y Perl 1979a), la cual no fue detectada en estudios basados en la degeneración transganglionar (Grant y Ygge, 1981), en el transporte anterógrado de aminoácidos radiactivos (Réthelyi *et al.*, 1979) o en la inyección de WGA-HRP en los ganglios dorsales (Arvidsson y Pfaller, 1990). Las investigaciones en las que se han utilizado los trazadores HRP y WGA-HRP han puesto de manifiesto la diferencia en el lugar de proyección de las fibras aferentes cutáneas, viscerales y propioceptivas. En general, se observan terminaciones de aferentes primarias cutáneas en las láminas I-V, aunque en algunos casos se determina una mayor densidad en las tres primeras capas (Willis, 1986). Por el contrario, las aferentes primarias viscerales (Cervero, 1989) y propioceptivas (Shigenaga *et al.*, 1988a) únicamente se arborizan en las láminas I y V, y en el caso de las viscerales preferentemente en la porción lateral de esta última lámina.

En relación a la naturaleza de las aferentes primarias que alcanzan la lámina V, se han observado terminales de fibras mielínicas de gran calibre, similares a las que se observan en la lámina IV (Grant, 1985), aunque también se han descrito fibras de pequeño calibre, probablemente amielínicas y de origen visceral, terminando en la lámina V (Cervero, 1989).

En la región lateral de la lámina V se ha descrito la presencia de fibras y terminales CGRP (Carlton *et al.*, 1988; Conrath *et al.*, 1989; Merighi *et al.*, 1990) y sustancia P (Itoh y Tessler, 1990) inmunorreactivas. Estos resultados corroboran la existencia de terminales nociceptivas en la región lateral de la lámina V, lo cual ya fuera propuesto por estudios electrofisiológicos (Brown, 1981; Ritz y Greenspan, 1985) al detectar la presencia de neuronas en la lámina V que respondían tanto a estímulos nociceptivos como no nociceptivos. Además, en las láminas III-V se han observado neuronas inmunorreactivas para el receptor neuroquinina 1, muchas de las cuales presentan grandes arborizaciones dendríticas orientadas dorsalmente, que atraviesan la sustancia gelatinosa alcanzando finalmente la lámina marginal (Brown *et al.*, 1995).

La contribución de las neuronas de la lámina V en los tractos espinotalámico (Apkarian y Hodge, 1989a,b,c) y espinomesencefálico (Zhang *et al.*, 1990) es importante. Igualmente, la lámina V muestra una participación en la vía espinoreticular, en general, superior a la de las láminas precedentes (Lima, 1990). Por otra parte, se han visto células de la lámina V que participan en las vías espinocervical (Pubols y Haring, 1995), propiospinal ascendente (English *et al.*, 1985) y descendente (Verburgh *et al.*, 1990), espinohipotálamica (Burstein *et al.*, 1990) y otras que proyectan hacia los núcleos de las columnas dorsales (Verburgh *et al.*, 1990).

1.5. Proteína c-fos

c-fos, al igual que *c-jun*, es un protooncogén que pertenece al tipo de los genes tempranos-inmediatos celulares (Curran y Morgan, 1987; Lau y Nathans, 1987; Morgan, 1991), adoptándose esta terminología por la homología observada entre esta clase de genes y los genes tempranos-inmediatos virales. Los genes tempranos-inmediatos virales se caracterizan por presentar una rápida activación transcripcional y codificar proteínas, incluso en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, responsables de regular la expresión de otros genes que están implicados en fases más tardías del ciclo de vida viral. *c-fos* es el homólogo celular del oncogén viral *v-fos* (Curran *et al.*, 1983; Van Beveren *et al.*, 1983), responsable de producir sarcomas osteogénicos en ratones, y el cual ha sido identificado en el virus del osteosarcoma murino FBJ (Curran y Teich, 1982). El nombre de ambos genes así como el de las proteínas codificadas por éstos (*c-fos* y *v-fos*, respectivamente) deriva del nombre del retrovirus donde *v-fos* fue aislado.

c-fos es una fosfoproteína nuclear (Curran *et al.*, 1984) de 380 amino ácidos (Curran, 1988; Sharp *et al.*, 1991) que presenta una masa molecular de 62 kDa (Aronin *et al.*, 1990), posee una vida media relativamente corta (aproximadamente de 2 horas) (Morgan y Curran, 1989) y experimenta una importante modificación post-traducción, la cual fundamentalmente incluye fosforilación (Curran *et al.*, 1984, 1987; Curran y Morgan, 1986). La cantidad producida de dicha proteína está directamente relacionada con el grado de activación sináptica (Williams *et al.*, 1989). De la misma forma que se ha visto para los productos proteicos de otros protooncogenes (ej. factor de crecimiento derivado de las plaquetas), el *c-fos* interviene en la cascada de transducción de señales, en su caso actuando como tercer mensajero nuclear (Curran y Morgan, 1987; Morgan y Curran, 1988; Morgan, 1991).

c-fos al igual que *c-jun*, también denominada proteína p39 y la cual es codificada por el protooncogén *c-jun* (Chiu *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988a; Sassone-Corsi *et al.*, 1988a), así como otras proteínas relacionadas con *fos* y *jun* presentan un dominio homólogo en el cual se diferencian dos regiones: una región que se conoce como cremallera de leucina (Cohen y Curran, 1988; Kouzarides y Ziff, 1988; Landschulz *et al.*, 1988; Ryder *et al.*, 1988) y otra región rica en amino ácidos básicos (Kouzarides y Ziff, 1988; Gentz *et al.*, 1989; Landschulz *et al.*, 1989; Turner y Tjian, 1989). Las cremalleras de leucina son hélices α anfipáticas que presentan 5 residuos de

leucina separados a intervalos de siete amino ácidos, estando las leucinas situadas cada dos giros de la hélice en la misma cara de la estructura (Landschulz *et al.*, 1988; Gentz *et al.*, 1989). Los residuos de leucina se numeran mediante los números arábigos 1-5, comenzando por el extremo amino terminal (Kouzarides y Ziff, 1988). La región rica en amino ácidos básicos, tales como arginina, se sitúa al comienzo del dominio homólogo, adyacente al residuo de leucina 1 (Kouzarides y Ziff, 1988; Gentz *et al.*, 1989).

c-fos participa en la regulación de la transcripción del protooncogén *c-fos* (Sassone-Corsi *et al.*, 1988a,b; Schöntal *et al.*, 1988) y en la de otros genes (Distel *et al.*, 1987; Morgan y Curran, 1989; Sonnenberg *et al.*, 1989c; Goodman, 1990), mediante su interacción con una secuencia de ADN constituida por 7 bases (TGACTCA; lugar de unión para AP-1) (Distel *et al.*, 1987; Curran y Franza, 1988; Franza *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988b,c; Gentz *et al.*, 1989). Esta secuencia un constituyente relativamente frecuente tanto de elementos reguladores transcripcionales positivos como negativos y el cual es necesario para la transcripción basal y estimulada de la expresión genética (Curran y Franza, 1988). Para que esta interacción tenga lugar, c-fos tiene que formar complejos heterodiméricos con otras proteínas como son c-jun (Curran *et al.*, 1985; Chiu *et al.*, 1988; Kouzarides y Ziff, 1988; Nakabeppu *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988a,c; Sassone-Corsi *et al.*, 1988a; Gentz *et al.*, 1989; Turner y Tjian, 1989), jun D (proteína relacionada con jun que es codificada por el gen *jun D*) (Nakabeppu *et al.*, 1988) y jun B (proteína relacionada con jun que es codificada por el gen *jun B*) (Nakabeppu *et al.*, 1988; Turner y Tjian, 1989). Estos complejos constituyen el denominado factor de transcripción AP-1 (activador de proteína 1), el cual fue originariamente mostrado unirse a la secuencia de ADN TGACTCA (o variantes cercanas a ésta) en células HeLa, presentes en estimuladores de varios genes virales y celulares incluyendo SV40 y el gen humano metalotioneína IIa (Lee *et al.*, 1987). Esta dimerización proteica, que da lugar al factor de transcripción AP-1, se produce mediante una interacción hidrofóbica paralela entre las cremalleras de leucina presentes en dichas proteínas (c-fos, c-jun, jun B, jun D) (Kouzarides y Ziff, 1988; Gentz *et al.*, 1989; Landschulz *et al.*, 1989; Turner y Tjian, 1989). Además de c-fos, dos proteínas relacionadas con fos (Fra-46K y Fra-35K) también pueden ser integrantes del factor de transcripción AP-1 (Cohen *et al.*, 1989; Bohmann *et al.*, 1988; Morgan, 1991). Las proteínas de la familia fos, a diferencia de las de la familia jun, no pueden formar homodímeros debido a fuerzas estructurales (Gentz *et al.*, 1989; Turner y Tjian, 1989; Morgan, 1991), sin embargo se ha visto que el complejo c-fos/c-jun se une al lugar de

reconocimiento para AP-1 con una afinidad superior (del orden de 30 veces) que el homodímero c-jun/c-jun (Rauscher *et al.*, 1988c). Se comprueba por tanto que el factor de transcripción AP-1 no es una entidad molecular única, sino más bien una mezcla de proteínas homo o heterodiméricas cuya composición y nivel varían como una función dependiente del tiempo, dada la diferente cinética de aparición y metabolización que presentan sus integrantes (Franza *et al.*, 1987; Cohen y Curran, 1988; Curran y Franza, 1988; Sharp *et al.*, 1991; Sonnenberg *et al.*, 1989a). Esta particularidad posibilita la coexistencia en una misma célula de varias formas moleculares del complejo AP-1 (Sonnenberg *et al.*, 1989a), de ahí que la iniciación de la transcripción de genes regulados por dicho factor dependa de las concentraciones así como de las afinidades de las proteínas para formar complejos homo y heterodiméricos (Curran y Franza, 1988). En este sentido, Sonnenberg *et al.* (1989a) han observado que la administración del fármaco convulsivante pentilenotetrazol induce c-fos así como Fra-46K y Fra-35K, siendo estas dos últimas proteínas expresadas y metabolizadas más tardíamente que el c-fos, lo que explica que los niveles del factor de transcripción AP-1 permanezcan elevados incluso a las 8 horas de la estimulación, momento en el que ningún c-fos está presente.

La unión del complejo heterodimérico al lugar de unión para AP-1 es mediada por una interacción cooperativa de las proteínas integrantes de dicho complejo, implicando la región de amino ácidos básicos que se encuentra fuera de la cremallera de leucina en ambas proteínas (Kouzarides y Ziff, 1988; Gentz *et al.*, 1989; Landschulz *et al.*, 1989; Turner y Tjian, 1989).

Concretamente, la proteína c-fos regula la transcripción de genes opioides (White y Gall 1987; Draisci y Iadarola 1989; Morgan y Curran 1989). Diversas investigaciones en las que se ha estudiado la distribución de la inmunorreactividad de c-fos en el asta dorsal de la médula espinal como consecuencia de una estimulación periférica (Weihe *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1987), han mostrado que ésta coincide con la distribución de neuronas que presentan opioides proencefalina o prodinorfina (Weihe *et al.*, 1991), o con la de neuronas que tienen niveles aumentados de ARNm preprodinorfina (Iadarola *et al.*, 1988; Ruda *et al.*, 1988) y/o ARNm preproencefalina (Iadarola *et al.*, 1988; Noguchi *et al.*, 1989). Por otra parte, se ha visto que el ARNm preproencefalina, un gen que presenta un elemento regulador que desde el punto de vista estructural está relacionado con el lugar de unión para AP-1 (Comb *et al.*, 1986), alcanza su máxima concentración posteriormente a que se produzca el mayor aumento de ARNm c-fos en el

hipocampo como consecuencia de convulsiones (White y Gall, 1987). Este hallazgo apoya la teoría de que *c-fos* regula la expresión del gen preproencefalina, desempeñando una función homeostática en el hipocampo (Morgan y Curran, 1989), al aumentar la expresión de dicho gen con el fin de reponer la provisión intracelular de encefalina que es liberada durante la actividad convulsivante (Hong *et al.*, 1980, 1985; Iadarola *et al.*, 1986), existiendo por tanto una relación entre estímulo-secreción y estímulo-transcripción.

En la mayoría de las células existen niveles basales bajos de expresión del protooncogén *c-fos* (Adamson *et al.*, 1985; Barka *et al.*, 1986; Sagar *et al.*, 1988; Menetrey *et al.*, 1989; Dragunow y Faull, 1990), los cuales pueden ser aumentados de manera rápida y transitoria (Dragunow y Robertson, 1987; Hunt *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1987; Sonnenberg *et al.*, 1989a; Szekely *et al.*, 1989; Bullitt, 1991) mediante estímulos extrínsecos (p. ej. Morgan *et al.*, 1987; Hisanaga *et al.*, 1992) que actúan en elementos reguladores localizados en el extremo 5' de dicho gen (Treisman, 1985; Sheng *et al.*, 1988; Morgan y Curran, 1989). Este incremento de la expresión de *c-fos* se produce tanto en células no neuronales (Barka *et al.*, 1986; Ran *et al.*, 1986; Verrier *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 1987; Dragunow *et al.*, 1990; Sharp *et al.*, 1990) como neuronales (ej. White y Gall, 1987; Jørgensen *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1991). Concretamente, en el sistema nervioso de mamíferos éste puede ser inducido mediante los segundos mensajeros diacilglicerol (Kruijer *et al.*, 1985; Milbrandt, 1986; Szekely *et al.*, 1989), AMPc (Kruijer *et al.*, 1985; Hisanaga *et al.*, 1990, 1992) y calcio (Greenberg *et al.*, 1986; Morgan y Curran, 1986; Hisanaga *et al.*, 1990) en respuesta a estímulos extracelulares tales como: isquemia cerebral (Jørgensen *et al.*, 1989; Onodera *et al.*, 1989); convulsiones inducidas eléctricamente (Dragunow y Robertson, 1987; Dragunow *et al.*, 1988; Sagar *et al.*, 1988), quirúrgicamente (White y Gall, 1987) o farmacológicamente por el pentilenotetrazol (Morgan *et al.*, 1987; Dragunow y Robertson, 1988a; Saffen *et al.*, 1988; Sonnenberg *et al.*, 1989a), el ácido kaínico (Le Gal La Salle 1988; Popovici *et al.*, 1988) o la picrotoxina (Saffen *et al.*, 1988); ésteres forbol (Greenberg *et al.*, 1985; Kruijer *et al.*, 1985; Milbrandt, 1986; Szekely *et al.*, 1989; Hisanaga *et al.*, 1990, 1992); estímulos osmóticos (Sharp *et al.*, 1991); manipulaciones hormonales (Jacobson *et al.*, 1990); estimulación nerviosa periférica, bien sea por estímulos nocivos (Hunt *et al.*, 1987; Menetrey *et al.*, 1989; Bullitt, 1991) o inocuos (Hunt *et al.*, 1987); factores tróficos tales como el factor de crecimiento nervioso (Curran y Morgan, 1985, 1986; Greenberg *et al.*, 1985; Kruijer *et al.*, 1985;

Milbrandt, 1986; Sharp *et al.*, 1989a), el factor de crecimiento fibroblástico (Greenberg *et al.*, 1985; Hisanaga *et al.*, 1990, 1992) o el factor de crecimiento epidérmico (Greenberg *et al.*, 1985; Kruijer *et al.*, 1985; Milbrandt, 1986; Hisanaga *et al.*, 1990); antagonistas no competitivos de los receptores NMDA (ej. MK-801, cetamina) (Dragunow y Faull, 1990); iones (Curran y Morgan, 1986; Hisanaga *et al.*, 1992); lesión cerebral (Dragunow y Robertson, 1988b; Sharp *et al.*, 1989a, 1990; Dragunow *et al.*, 1990); neurotransmisores colinérgicos (Greenberg *et al.*, 1986), glutamérgicos (Szekely *et al.*, 1987, 1989; Kaczmarek *et al.*, 1988; Sonnenberg *et al.*, 1989b; Sharp *et al.*, 1990; Hisanaga *et al.*, 1992), o adrenérgicos (Kaczmarek *et al.*, 1988); condiciones que inducen despolarización de la membrana celular (Greenberg *et al.*, 1985; Kruijer *et al.*, 1985; Curran y Morgan, 1986; Morgan y Curran, 1986; Bartel *et al.*, 1989; Hisanaga *et al.*, 1992); estimulación mediante luz (Aronin *et al.*, 1990; Sagar y Sharp, 1990); sección nerviosa periférica (Sharp *et al.*, 1989c); estimulación eléctrica cortical (Sagar *et al.*, 1988; Sharp *et al.*, 1989b); deshidratación (Sagar *et al.*, 1988) y; fármacos tales como agonistas nicotínicos (Greenberg *et al.*, 1986) o morfina (Chang *et al.*, 1988).

Debido a que en la mayoría de las regiones del sistema nervioso central la expresión basal del protooncogén *c-fos* es relativamente baja (Menetrey *et al.*, 1989; Dragunow y Faull, 1990; Sharp *et al.*, 1991), la evaluación de la inducción de *c-fos* al igual que la técnica autorradiográfica 2-desoxiglucosa, puede ser usada como un marcador de actividad neuronal (Morgan *et al.*, 1987; Sagar *et al.*, 1988; Jacobson *et al.*, 1990; Oakden y Boissonade, 1998), pero con la ventaja frente a esta última de que ofrece resolución celular, dado que la tinción inmunohistoquímica de fos se localiza en el núcleo de las neuronas, por lo que permite discriminar entre elementos pre y postsinápticos en tractos polisinápticos (Morgan y Curran, 1989). Sin embargo, ambas técnicas no pueden ser indistintamente empleadas ya que se ha observado que aunque en algunas ocasiones la distribución de neuronas fos positivas es análoga a la distribución de neuronas con absorción de 2-desoxiglucosa (Sharp *et al.*, 1989b), en otras se ha detectado bien un aumento del metabolismo de la glucosa en regiones donde existe actividad neuronal que no es acompañada por la inducción de *c-fos*, bien inmunorreactividad de fos en células donde la absorción de 2-desoxiglucosa no aumenta e incluso a veces disminuye (Morgan, 1991). Por ejemplo, Sagar *et al.* (1988) han observado que la expresión de fos en la división magnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo inducida por deshidratación, no se asocia con un

incremento del metabolismo de la glucosa, aunque la actividad eléctrica está aumentada; de la misma forma que Jørgensen *et al.* (1989) han detectado un aumento en la expresión de *c-fos* en la capa CA1 del hipocampo como consecuencia de la isquemia cerebral, mientras que la absorción de 2-desoxiglucosa está disminuida. Las discrepancias observadas entre el método inmunohistoquímico fos y la técnica 2-desoxiglucosa se pueden deber a que fos es una tinción nuclear que sólo marca cuerpos celulares activados, mientras que la autorradiografía con 2-desoxiglucosa por el contrario suministra una medida de la utilización de glucosa por toda la célula, siendo más sensible a alteraciones en la actividad funcional que tienen lugar en el neuropilo que en el cuerpo celular (Sagar *et al.*, 1988).

De manera más específica, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente junto con hallazgos tales como que: a) la estimulación de tractos nociceptivos periféricos conlleva la inducción de *c-fos* en el sistema nervioso central (Anton *et al.*, 1991; Bullitt, 1991; Allen *et al.*, 1996); b) la morfina así como otros analgésicos que actúan a nivel central disminuyen la expresión de dicha proteína en regiones del asta dorsal que contienen neuronas que responden a estimulación nociva, siendo esta disminución invertida por la naloxona (Presley *et al.*, 1990); y c) los estímulos nocivos en el sistema somatosensorial sean los más efectivos en la inducción de *c-fos* (Hunt *et al.*, 1987); han confirmado la utilidad de la fosfoproteína *c-fos* como un marcador de tractos nociceptivos (Takemura *et al.*, 2000a; Chattipakorn *et al.*, 2005). A pesar de que la expresión de *c-fos* se ha dicho que no es capaz de identificar todas las células que responden o codifican información nociceptiva (Hunt *et al.*, 1987; Chattipakorn *et al.*, 2005), este procedimiento solventa muchos problemas inherentes a las técnicas electrofisiológicas (Oakden y Boissonade, 1998). Entre estas limitaciones cabe destacar las siguientes: sólo un pequeño número de células pueden ser examinadas en cada animal, los registros con frecuencia son realizados en muestras sesgadas, es difícil marcar las células después del registro para permitir su posterior estudio histológico, y la repetición de estímulos, la cual es empleada cuando se busca una neurona, reduce la excitabilidad (Boissonade y Matthews, 1993).

A modo de resumen de lo mencionado anteriormente, se puede concluir que la proteína *c-fos* es un excelente marcador polisináptico que permite, tras la aplicación de un estímulo periférico, marcar neuronas de primer, segundo y tercer orden de una vía nerviosa. Así por ejemplo, en la vía espinoparabraquial, Bester *et al.* (1997) hallaron inmunorreactividad de *c-fos* en neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula

espinal y de tercer orden en el complejo parabraquial, después de una estimulación térmica nociva de la pata. De modo análogo, en la vía trigeminoparabraquial se demostró, tras la estimulación nociceptiva orofacial, expresión de c-fos en neuronas de segundo orden en el núcleo caudal del trigémino (Yamashiro *et al.*, 1997) y de tercer orden en el complejo parabraquial (Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Yamashiro *et al.*, 1997).

2. Justificación y objetivos



La región orofacial, especialmente las zonas perioral y perinasal, es una de las áreas del cuerpo más densamente inervadas (Raboisson y Dallel, 2004) y, en consecuencia, la que presenta algunos de los cuadros dolorosos agudos más comunes, como los propios de patologías de los dientes y estructuras relacionadas, o los dolores crónicos (ej. migrañas, neuralgias trigeminales) y referidos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otras regiones corporales, los mecanismos responsables de estas algias orofaciales todavía no son bien conocidos, lo que principalmente es debido a la mayor complejidad de las vías cefálicas frente a las vías espinales. Así, por ejemplo, cabe mencionar que, mientras que las aferentes primarias espinales establecen sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal (Light y Perl, 1979a,b; Matsushita y Tanami, 1983), las fibras primarias trigeminales terminan en el equivalente medular del asta dorsal espinal, el núcleo caudal del trigémino, y en las astas dorsales de los primeros segmentos cervicales (Torvik, 1956; Marfurt, 1981; Jacquin *et al.*, 1982, 1983, 1990; Jacquin y Rhoades, 1983; Shigenaga *et al.*, 1986a, 1988a; Takemura *et al.*, 1987, 1991; Pfaller y Arvidsson, 1988; Segade *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997b), pero también se arborizan en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Torvik, 1956; Marfurt, 1981; Jacquin *et al.*, 1982, 1983 y 1990; Jacquin y Rhoades, 1983; Shigenaga *et al.*, 1986b, 1988a; Takemura *et al.*, 1987, 1991; Pfaller y Arvidsson, 1988; Marfurt y Rajchert, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997b), en el núcleo del fascículo solitario (Torvik, 1956; Contreras *et al.*, 1982; Jacquin *et al.*, 1982; Nomura *et al.*, 1984; Takemura *et al.*, 1987, 1991; Segade *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991), en el núcleo supratrigeminal (Jacquin *et al.*, 1982, 1983; Takemura *et al.*, 1987; Marfurt y Rajchert, 1991), en el núcleo paratrigeminal (Takemura *et al.*, 1987; Marfurt y Rajchert, 1991), en el complejo parabraquial (Panneton, 1991; Segade, 2003), además de otras localizaciones en el tallo cerebral (Jacquin *et al.*, 1982; Marfurt y Rajchert, 1991).

En el hombre, como en los demás mamíferos, el nervio trigémino es el encargado de transportar hacia el sistema nervioso central toda la información somatosensorial de la región orofacial, y, tal como se ha mencionado en el párrafo precedente, esta información es recibida mayoritariamente en el bulbo raquídeo por el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Kappers *et al.*, 1936; Anthony, 1972; Kuhlenbeck, 1975; Brodal, 1981). Desde principios del siglo pasado, en los mamíferos fue validada la subdivisión del complejo nuclear sensitivo del trigémino en dos porciones: núcleo sensitivo principal y núcleo descendente o espinal (Cajal, 1909;

Kappers *et al.*, 1936; Woodburne, 1936). Este último se ha subdividido a su vez en tres agrupaciones neuronales: núcleo oral, núcleo interpolar y núcleo caudal, que fueron identificados atendiendo a criterios citoarquitectónicos por Olszewski (1950).

Antiguamente se creía que las neuronas del complejo nuclear sensitivo del trigémino presentaban una organización rostrocaudal que guardaba relación con las distintas modalidades de información somatosensorial de la región orofacial; siendo la información térmica y dolorosa transmitida a centros nerviosos superiores a partir del núcleo caudal del trigémino, y la sensibilidad táctil codificada en divisiones más rostrales, fundamentalmente en los núcleos principal y oral del trigémino (Spiller, 1915; Sjöqvist, 1938). Sin embargo, esta hipótesis actualmente ha sido desestimada, ya que tanto las neuronas trigeminales que responden a estímulos táctiles como a estímulos nociceptivos se encuentran en casi toda la extensión del complejo nuclear sensitivo del trigémino (Gordon *et al.*, 1961; Wall y Taub, 1962; Eisenman *et al.*, 1963; Darian-Smith, 1966; Azerad *et al.*, 1982).

La teoría de que el núcleo caudal del trigémino es el principal centro de segundo orden de transmisión a centros superiores de la información nociceptiva orofacial fue inicialmente sostenida por trabajos de tipo clínico. Las tractotomías trigeminales medulares, realizadas 6-8 mm (Sjöqvist, 1938) o 10 mm (Hamby *et al.*, 1948) caudalmente al óbex para dejar intactos los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, dieron como resultado un estado de profunda analgesia en casi toda la región orofacial, con mucha menor afectación de la sensibilidad táctil. Contribuyeron a fortalecer esta hipótesis hallazgos posteriores tales como: a) el registro de actividad neuronal en el núcleo caudal del trigémino tras la estimulación nociceptiva orofacial (Price *et al.*, 1976; Shigenaga *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984; Jacquin *et al.*, 1986a; Renehan *et al.*, 1986); b) la densa proyección hacia el núcleo caudal del trigémino de fibras nociceptivas, por ejemplo, aquellas marcadas con isolectina B4 conjugada con HRP (Sugimoto *et al.*, 1997b) o que expresan CGRP (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Boissonade *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a) y/o sustancia P (Boissonade *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1997a); c) la demostración de neuronas trigeminotalámicas nociceptivas localizadas en el núcleo caudal del trigémino (Price *et al.*, 1976; Hu *et al.*, 1981; Dickenson y Le Bars, 1983; Dubner y Bennett, 1983).

Investigaciones posteriores abordadas desde una perspectiva electrofisiológica comenzaron a poner en entredicho la exclusividad del núcleo caudal del trigémino como

centro de codificación de la información nociceptiva orofacial. En este sentido, cabe destacar especialmente los hallazgos del grupo de investigación de Dallel. La persistencia de actividad neuronal en el complejo ventrobasal del tálamo (Dallel *et al.*, 1988; Raboisson *et al.*, 1989) o la inalterabilidad en el umbral de respuestas reflejas nociceptivas (Dallel *et al.*, 1989), tras la estimulación nociva de campos receptivos orofaciales y tras la deaferenciación del núcleo caudal del trigémino, abogaban por la participación de los núcleos rostrales en la transmisión de la información nociceptiva orofacial. De un modo similar, la identificación fisiológica en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino de neuronas que respondieron a estímulos dañinos producidos en campos periféricos peri o intraorales (Dallel *et al.*, 1990; Raboisson *et al.*, 1995), así como la elevación de los umbrales de reacciones aversivas en respuesta a la estimulación facial pero no intraoral, tras la práctica de una tractotomía trigeminal (Young y Perryman, 1984, 1986), sugerían que los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino intervienen, de alguna manera, en la transmisión de la información nociceptiva orofacial. A modo de resumen, los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino participarían en la recepción de estímulos nociceptivos procedentes principalmente de la boca y estructuras circundantes, y en menor medida de zonas faciales cutáneas, en las cuales cobraría un mayor protagonismo el núcleo caudal del trigémino. Consistente con esta afirmación, están los resultados obtenidos a partir de estudios anatómicos con neurotrazadores aplicados a las cámaras pulpares de dientes de mamíferos. Es sabido que la pulpa de los dientes de los mamíferos está en una gran medida inervada por fibras de tipo nociceptivo (tipos C y A δ) (Johnsen y Johns, 1978; Bishop, 1981; Fried y Hildebrand 1981; Holland y Robinson, 1983; Johnsen *et al.*, 1983). Los estudios con neurotrazadores sobre la terminación de las aferentes primarias pulpares en el bulbo raquídeo mostraron que se hallan a lo largo de todo el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Westrum *et al.*, 1980, 1981; Arvidsson y Gobel, 1981; Marfurt y Turner, 1984; Ishidori *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986c, 1989) y, por lo tanto, ello sugirió que algunas de estas regiones rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino estarían implicadas en la recepción nociceptiva oral.

Las investigaciones más recientes basadas en la detección inmunohistoquímica de la proteína c-fos han contribuido de manera importante a esclarecer qué núcleos del tallo nervioso participan en el procesamiento central del dolor orofacial. Esta proteína es un marcador nuclear polisináptico, que permite saber qué neuronas en el sistema

nervioso central son activadas como consecuencia de estímulos periféricos de diversa naturaleza, incluyendo, por supuesto, aquellos de naturaleza dañina (Bester *et al.*, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Yamashiro *et al.*, 1997). La aplicación en **regiones intraorales** de diversos estímulos nocivos, tales como mecánicos (Strassman y Vos, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Aihara *et al.*, 1999; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000), químicos (Segade *et al.*, 1992; Carstens *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000; Chattipakorn *et al.*, 2002, 2005), térmicos (Coimbra y Coimbra, 1994; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2005), eléctricos (Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998) o inflamatorios (Byers *et al.*, 2000), han evidenciado la presencia de neuronas c-fos positivas en el núcleo caudal del trigémino, fundamentalmente en las láminas superficiales (Segade *et al.*, 1992; Strassman y Vos, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998b; Carstens *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000), en el asta dorsal del primer segmento cervical (C1) (Segade *et al.*, 1992; Strassman y Vos, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Iwata *et al.*, 1998; Byers *et al.*, 2000), en la zona de transición del núcleo caudal del trigémino con el núcleo interpolar del trigémino (Segade *et al.*, 1992; Coimbra y Coimbra, 1994; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005), en la división dorsomedial del núcleo interpolar del trigémino (Allen *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1998a) y en la división dorsomedial del núcleo oral del trigémino (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000). Por el contrario, la aplicación en **regiones periorales** y/o en **zonas faciales cutáneas** de estímulos dañinos de naturaleza química (Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Wang *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997), térmica (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Meng y Bereiter, 1996) o mecánica (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Vos y Strassman, 1995) únicamente han revelado la presencia de neuronas c-fos positivas en el núcleo caudal del trigémino (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Wang *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997) y en C1 (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Bereiter *et al.*,

1998), en la formación reticular adyacente al núcleo espinal trigeminal (Wang *et al.*, 1994; Mineta *et al.*, 1995); y en la región de transición del núcleo caudal del trigémino con el núcleo interpolar del trigémino (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997).

A modo de resumen de lo comentado anteriormente, los estudios sobre la expresión de c-fos en el bulbo raquídeo sugieren que el procesamiento de la **información nociceptiva facial** únicamente parece implicar regiones trigeminales caudales a la transición de los núcleos interpolar y caudal, en contraste con lo sugerido por las investigaciones electrofisiológicas anteriormente citadas, que atribuían un cierto protagonismo a las divisiones rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino en la codificación de la información algica perioral. Por el contrario, la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino confirma que la **información nociceptiva intraoral** es codificada principalmente por neuronas localizadas en el núcleo caudal del trigémino y asta dorsal de C1 y rostralmente en la región dorsomedial del núcleo oral del trigémino. Precisamente, en esta región dorsomedial es donde terminan aferentes primarias trigeminales procedentes de la pulpa de los dientes superiores e inferiores (Marfurt y Turner, 1984; Ishidori *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986c, 1989). En todas estas investigaciones no se ha detectado expresión de c-fos en neuronas pertenecientes a la región ventral del núcleo oral del trigémino. En conformidad con esta última observación, cabe destacar que la estimulación eléctrica del ganglio de Gasser, sin tener en consideración el área inervada por las neuronas trigeminales, indujo inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal de las láminas superficiales del núcleo caudal y en las divisiones dorsal o dorsomedial de los núcleos principal, oral e interpolar del trigémino (Takemura *et al.*, 2000a,b; 2001), regiones que reciben una importante proyección de aferentes primarias con CGRP y/o sustancia P (Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a, 1998a).

A excepción de las escasas investigaciones llevadas a cabo en el gato (Bereiter *et al.*, 1994; Iwata *et al.*, 1998) o en el hurón (Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005), los estudios inmunohistoquímicos con c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, después de una estimulación periférica orofacial, se han realizado en la rata, y, en gran medida, sus conclusiones se han extrapolado a los mamíferos superiores. Sin embargo, sabemos que hay importantes diferencias entre la rata y otros mamíferos en lo referente a la citoarquitectura, conexiones y distribución de

neuropéptidos en el sistema nervioso central. Por ejemplo, en el gato existe expresión de CGRP en el núcleo ventral oral del trigémino (Henry *et al.*, 1996), lo que no sucede en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a). Igualmente, la rata presenta notables diferencias con el cobaya, una especie animal cuya clasificación en el orden de los roedores ha sido cuestionada recientemente (Graur *et al.*, 1991; Novacek, 1992). En este sentido puede citarse la existencia en el complejo ventrobasal talámico del cobaya de interneuronas GABAérgicas (Spreafico *et al.*, 1994; Arcelli *et al.*, 1997), que no están presentes en la rata (Arcelli *et al.*, 1997), o la distinta distribución en el sistema nervioso central de receptores del neuropéptido Y (Gehlert y Gackenhaimer, 1997), de CGRP (Réthelyi *et al.*, 1989b) y de sustancia P (Gallagher *et al.*, 1992). De hecho, alguna de estas características, como la distribución de somas y fibras con sustancia P en el córtex y en el hipocampo del cobaya (Gallagher *et al.*, 1992) sugiere, con respecto a la rata, una mayor similitud entre el cerebro del cobaya y el de los primates (Iritani *et al.*, 1989) incluido el hombre (Sakamoto *et al.*, 1985; Mai *et al.*, 1986; Del Fiacco *et al.*, 1987). Estas últimas observaciones conducen a pensar que el cobaya puede ser un modelo animal más adecuado que la rata para el estudio experimental del sistema nervioso central, y que los hallazgos en el cobaya puedan extrapolarse con mayor fiabilidad al sistema nervioso central de los primates. La presente Tesis Doctoral también se ha realizado en este animal con la finalidad de determinar posibles diferencias interespecíficas en los mamíferos en cuanto al procesamiento central de la información nociceptiva orofacial.

Puesto que en nuestros resultados se constata la existencia de neuronas nociceptivas en los núcleos rostrales del trigémino y, particularmente, en el núcleo oral, también se ha estudiado la posible regulación de la actividad de estas neuronas por un sistema GABAérgico. Se sabe que la transmisión de señales nociceptivas desde el núcleo oral del trigémino está sometida a controles inhibidores nocivos difusos mediados por mecanismos supraespinales (Dallel *et al.*, 1990; Raboisson *et al.*, 1995). Además, recientemente se ha visto que en la rata la actividad de las células nociceptivas de los núcleos rostrales del trigémino es regulada por sistemas neuronales inhibitorios, tales como el opioide (Dallel *et al.*, 1998) y el GABAérgico (Takemura *et al.*, 2001). Así, la microinyección de morfina en el núcleo caudal del trigémino deprime las respuestas de neuronas nociceptivas del núcleo oral del trigémino (Dallel *et al.*, 1998), lo que confirma la existencia de conexiones intranucleares ascendentes en el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Ikeda *et al.*, 1984; Nasution y Shigenaga, 1987). Por

otro lado, Takemura *et al.* (2001) registraron un aumento de la inmunorreactividad de c-fos en los núcleos principal, oral e interpolar del trigémino, inducida por estimulación del ganglio de Gasser, cuando previamente se administró un antagonista del GABA_B, y el efecto inverso tras la administración de un agonista del GABA_B. La creciente evidencia de proyecciones inhibitorias que reciben los núcleos trigeminales, nos ha conducido a evaluar en el presente trabajo si el sistema GABAérgico media estos mismos efectos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya.

Así pues, los objetivos de nuestra Tesis Doctoral pueden resumirse en los que se enumeran a continuación:

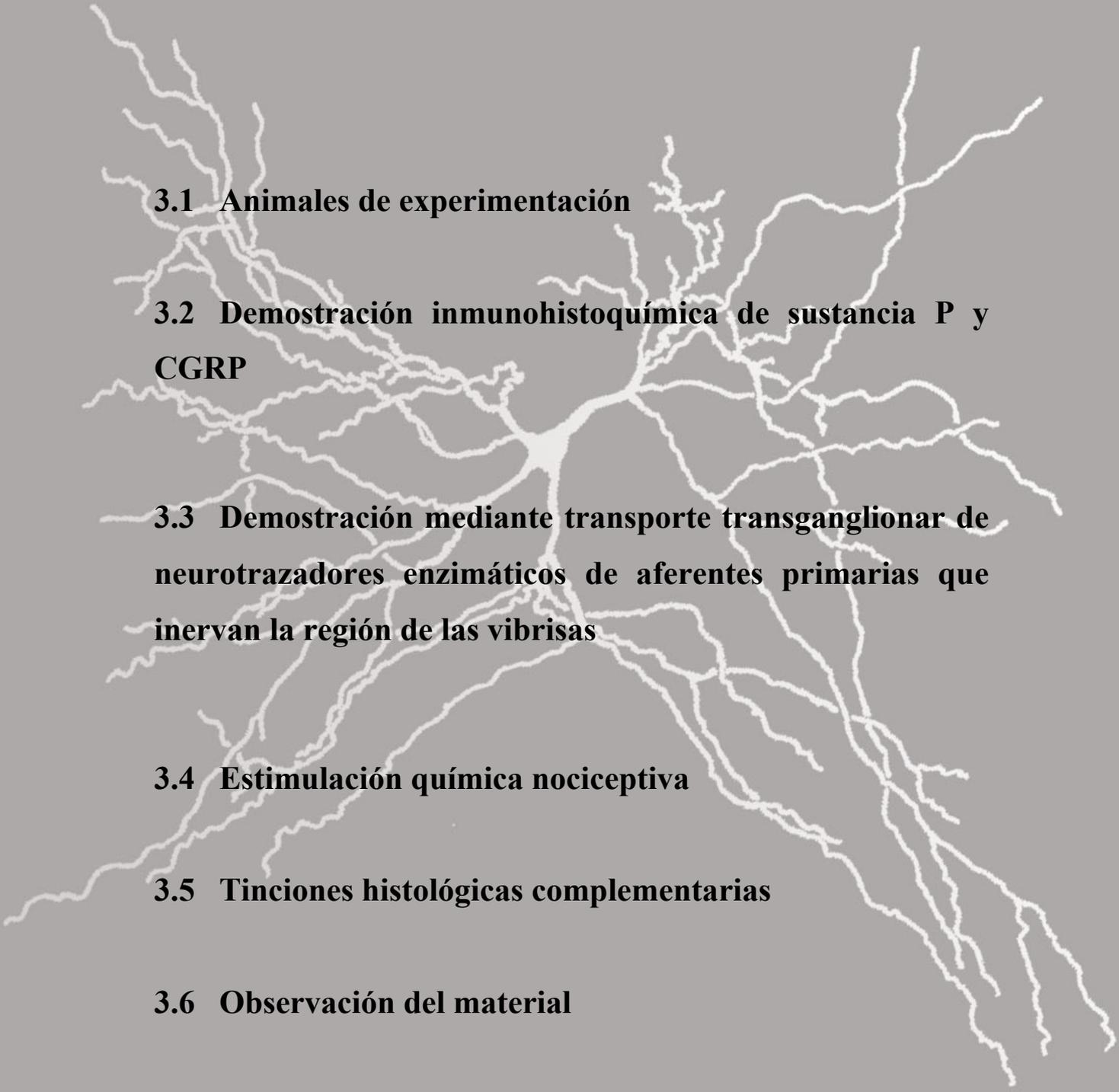
1. Verificar si los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya, y en especial la subdivisión ventral del núcleo oral, participan en la recepción central de la información nociceptiva de las regiones faciales cutáneas, habiendo escogido para ello una región ampliamente conocida, la zona de las vibrisas. Para ello se aplicarán diversos irritantes químicos en la región central subcutánea de las vibrisas y luego se detectará la expresión de c-fos en el bulbo raquídeo y médula cervical espinal. También para comprender si esta activación neuronal es monosináptica o polisináptica, se inyectarán en esta región subcutánea trazadores neuroanatómicos con capacidad de transporte transganglionar y se analizará la expresión central de ciertos neuropéptidos implicados en el procesamiento del dolor.

2. Establecer si existen diferencias en cuanto a la capacidad de distintos agentes irritantes químicos a la hora de inducir expresión de c-fos en las zonas rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya. Compararemos la eficacia de la formalina, la capsaicina y el aceite de mostaza. Las dos primeras sustancias se han empleado en modelos o test del dolor experimental (Clavelou *et al.*, 1995; Pelissier *et al.*, 2002; Raboisson y Dallel, 2004), mientras que el aceite de mostaza es cada vez más empleado, puesto que produce hiperalgesia, alodinia e inflamación en las zonas en las que es aplicado (Simons *et al.*, 2004).

3. Demostrar si la expresión de c-fos en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya es afectada por agonistas y antagonistas del sistema GABA_B. Hemos elegido estos fármacos GABAérgicos debido a la amplia versatilidad funcional con la que cuentan actualmente. El agonista del sistema GABA_B por su aplicación clínica como agente antiespástico, relajante muscular y analgésico

(Fromm y Terrence, 1987; Penn *et al.*, 1989) y el antagonista GABAérgico por su aplicación experimental para inducir cuadros convulsivos (Salazar, 2005).

3. Material y métodos



3.1 Animales de experimentación

3.2 Demostración inmunohistoquímica de sustancia P y CGRP

3.3 Demostración mediante transporte transganglionar de neurotrazadores enzimáticos de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas

3.4 Estimulación química nociceptiva

3.5 Tinciones histológicas complementarias

3.6 Observación del material

3.1. Animales de experimentación

La investigación fue realizada en un total de 43 cobayas o conejillos de Indias de la variedad tricolor (*Cavia porcellus*), de ambos sexos (23 machos y 20 hembras), con un peso comprendido entre 500 y 875 g. Los animales fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, en condiciones controladas de temperatura ambiente, alimentándose con pienso enriquecido en vitamina C. Durante todo este tiempo, los cobayas permanecieron en jaulas de aluminio abiertas, estando 2-3 cobayas como máximo por jaula y se sometieron a ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, durante los cuales tuvieron libre acceso a comida y agua.

La mayoría de los zoólogos consideran que el cobaya doméstico descende de la especie *Cavia porcellus*, procedente de Sudamérica; sin embargo, algunos investigadores suponen que procede de otra especie próxima originaria del Perú, *Cavia cutleri*. Este mamífero se caracteriza por presentar orejas cortas, 4 dedos en las extremidades anteriores y 3 en las posteriores, 20 dientes (4 incisivos, ningún canino, 4 premolares y 12 molares), un tamaño intermedio (22-35 cm) y ausencia de cola. La especie pertenece a la familia Cávidos y superfamilia Cavioides.

Los 43 cobayas fueron distribuidos en cuatro grupos de experimentación. En el grupo 1, se determinó la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, así como en otras áreas del tronco encefálico y en la médula cervical superior, tras la aplicación de estímulos químicos periféricos periorales; en el grupo 2, se investigó la presencia de los neuropéptidos nociceptivos CGRP y sustancia P en estas mismas regiones del sistema nervioso central; en el grupo 3, se estudió el lugar de proyección central de aferentes primarias trigeminales que inervan la región de las vibrissas mediante tres trazadores enzimáticos; y en el grupo 4, se realizó un análisis topográfico de la organización nuclear del tronco encefálico y médula espinal cervical superior (Tabla 1).

Con la finalidad de establecer comparaciones con la expresión de c-fos registrada en el complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya, la activación neuronal tras la administración de un estímulo nociceptivo periférico también fue estudiada en dos ratas Wistar.

CLASIFICACIÓN DE LAS EXPERIMENTACIONES				Nº cobayas
GRUPO 1	Expresión de c-fos	Estímulo aplicado	Capsaicina	4
			Formalina	4
			Aceite de mostaza	4
			Aceite de mostaza + faclofeno	4
			Aceite de mostaza + baclofeno	4
			Solución salina	3
			Aceite mineral	3
			Ninguno	3
GRUPO 2	Inmunorreactividad de	CGRP		3
		Sustancia P		2
GRUPO 3	Proyecciones trigeminales	Trazador	WGA-HRP	2
			CTb-HRP	2
			IB4-HRP	2
GRUPO 4	Organización nuclear del sistema nervioso central			3
Total				43

Tabla 1. Distribución de los cobayas utilizados en los cuatro grupos de experimentación.

3.2. Demostración inmunohistoquímica de sustancia P y CGRP

La **sustancia P**, un undecapéptido que pertenece a la familia de las taquicininas y que fue aislado a partir del hipotálamo bovino por Chang y Leeman (1970), ha sido el primer neuropéptido caracterizado en el sistema nervioso periférico.

Los estudios pioneros (Hökfelt *et al.*, 1975, 1976) ya constataron la presencia de sustancia P principalmente en células ganglionares de pequeño y mediano tamaño, lo cual ha sido verificado posteriormente en múltiples investigaciones (Kuwayama *et al.*, 1987; Fried *et al.*, 1989). La relación que este neuropéptido presentaba con este tipo de neuronas, hizo pensar en la sustancia P como un neurotransmisor de tractos aferentes nociceptivos. Entre las evidencias que vinieron a reforzar la participación de la sustancia P en los procesos álgicos se encuentran las siguientes: a) en las láminas I y II de la médula espinal se ha registrado la presencia masiva de terminales sustancia P inmunorreactivas (Knyihár-Csillik *et al.*, 1990; Marlier *et al.*, 1990); b) la aplicación directa de sustancia P excita neuronas del asta dorsal que responden a estímulos nocivos (Randic y Miletic, 1979); c) la sustancia P es liberada desde la médula espinal tras la estimulación eléctrica de fibras A δ y C (Yaksh *et al.*, 1980).

El **CGRP**, identificado originariamente como un producto de expresión alternativo del gen que codifica la calcitonina (Amara *et al.*, 1982, 1985; Rosenfeld *et al.*, 1983, 1984) se encuentra ampliamente distribuido en los sistemas somatosensoriales central (Boissonade *et al.*, 1993) y periférico (Henry *et al.*, 1996).

Una gran proporción de somas neuronales primarios de pequeño a mediano tamaño (Skofitsch y Jacobowitz, 1985b) fundamentalmente del ganglio de la raíz dorsal (Ju *et al.*, 1987) y del ganglio trigeminal (Mason *et al.*, 1984) expresan CGRP. En los tejidos periféricos, esta inmunorreactividad se localiza en axones sensitivos que inervan la vasculatura y el epitelio mediante terminaciones nerviosas libres (Gibbins *et al.*, 1985), caracterizándose estos axones periféricos por ser de tipo amielínico o mielinizado de pequeño calibre (Yamamoto y Senba, 1990) y ser sensibles al tratamiento neonatal con capsaicina (Hammond y Ruda, 1991). En base a lo comentado anteriormente se aprecia que la inmunorreactividad de CGRP está presente en un subgrupo de somas celulares aferentes primarios así como en sus fibras (Traub *et al.*, 1990).

En la médula espinal, la expresión de CGRP es muy intensa en las láminas I y II, aunque también está presente en las láminas V y X, siendo las células del ganglio de la raíz dorsal la principal, sino la única, fuente de inmunorreactividad CGRP a este nivel (Gibson *et al.*, 1984). Además, este neuropéptido se ha visto que produce una inhibición *in vitro* de la degradación de la sustancia P (LeGreves *et al.*, 1985), que aumenta el reflejo espinal mediado por fibras C cuando es administrado intratecalmente (Xu *et al.*, 1990), y que presenta una amplia colocalización con el marcador de nociceptores primarios sustancia P (Gibbins *et al.*, 1985). Concretamente, Gibson *et al.* (1984), Chung *et al.* (1988), y Pohl *et al.* (1990) han mostrado que la rizotomía dorsal reduce el nivel de CGRP y sustancia P en el asta dorsal espinal en un 90-97% y en un 60%, respectivamente. Estos tres hallazgos sugieren que el CGRP desempeña un papel neuromodulador en el procesamiento de la información nociceptiva, además de funcionar como una molécula efectora en la periferia (Micevych y Kruger, 1992). Igualmente, la evidencia de que las fibras CGRP inmunorreactivas puedan estar implicadas, en base a su capacidad de regeneración, en la recidiva del dolor en humanos que algunas veces tiene lugar tras lesiones del ganglio de Gasser o del tracto trigeminal espinal (Henry *et al.*, 1996), sustentan la hipótesis de la implicación de este neuropéptido en la nocicepción, a pesar de que la administración intratecal de CGRP no induzca un comportamiento nociceptivo, el cual sí es registrado cuando se administra sustancia P (Gamse y Saria, 1986). Más específicamente, Boissonade *et al.* (1993) han observado que la distribución de fibras CGRP inmunorreactivas se solapa con los lugares de terminación de fibras aferentes intraorales en el gato (Shigenaga *et al.*, 1986b) y en la rata (Marfurt y Turner, 1984), lo que hace plausible que parte de este marcaje represente el lugar de terminación de aferentes primarias nociceptivas intraorales.

3.2.1. Método inmunohistoquímico

En los animales reservados para la demostración inmunohistoquímica de los neuropéptidos CGRP y sustancia P, la técnica operatoria y de perfusión, así como la sección de los bloques de tejido nervioso, y el tratamiento de los cortes previo y posterior a la incubación en los anticuerpos primario y secundario, se ha efectuado de la misma manera que en los animales empleados para el estudio de la expresión de la proteína c-fos (apartados 3.4.2 y 3.4.3).

Una vez las secciones fueron lavadas profusamente con PBS tras el tratamiento con borohidruro de sodio (S9125, Sigma) al 1% y peróxido de hidrógeno (107210, Merck) al 5%, los cortes empleados para estudiar:

- La inmunorreactividad de CGRP, fueron incubados en un anticuerpo primario anti-CGRP elaborado en conejo (Tabla 2), reaccionando posteriormente el producto de reacción con un anticuerpo secundario conjugado con biotina elaborado en cabra (BA1000, Vector Laboratories, dilución 1:500).
- La inmunorreactividad de sustancia P, fueron incubados en un anticuerpo primario monoclonal anti-sustancia P elaborado en ratón (Tabla 2), reaccionando posteriormente el producto de reacción con un anticuerpo secundario conjugado con biotina elaborado en cabra (BA9200, Vector Laboratories, dilución 1:500).

COBAYA N°	PESO	ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN
030	750 g	Anti-CGRP (RPN 1842, Amersham Biosciences)	1:4000
031	850 g		
032	800 g		
033	875 g	Anti-sustancia P (ab14184, abcam)	1:2000
034	800 g		

Tabla 2. Animales empleados para el estudio inmunohistoquímico de CGRP y sustancia P.

En ambos casos las secciones fueron incubadas en el anticuerpo primario durante 60-63 horas a 4°C y en el anticuerpo secundario durante 90 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, realizándose 3 lavados con PBS de 15 minutos cada uno tras la aplicación de ambos anticuerpos. Todos los anticuerpos fueron diluidos en tampón fosfato salino 0,05M pH 7,4 con 0,4% de tritón X-100 (T9284, Sigma-Aldrich).

Seguidamente, los cortes fueron tratados durante 75-90 minutos a temperatura ambiente y agitación suave en una solución del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit ABC Elite Vectastain, PK6100, Vector Laboratories) recién preparada. Después de efectuar tres lavados con PBS de 15 minutos cada uno, las secciones fueron reveladas con el cromógeno tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB, D5637, Sigma-Aldrich); inicialmente el tejido fue incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía DAB al 0,05% en PBS, seguido por un tiempo adicional

de 4-10 minutos en esta misma solución, pero a la que a mayores se le añadió el sustrato peróxido de hidrógeno al 0,01%.

Las secciones fueron posteriormente aclaradas en PBS, montadas en portaobjetos SuperFrost® Plus (Menzel-Glaser), secadas al aire, deshidratadas en alcoholes (Guinama) de graduación creciente, comenzando en alcohol de 70° hasta alcohol absoluto, y aclaradas con xileno (211769, Panreac). Finalmente fueron puestos los cubreobjetos, empleando como resina de montaje Entellan (107961, Merck).

3.3. Demostración mediante transporte transganglionar de neurotrazadores enzimáticos de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas

Las proyecciones primarias de la región de las vibrisas han sido estudiadas mediante tres trazadores neuroanatómicos: el conjugado de la aglutinina de trigo (WGA) con la peroxidasa de rábano (HRP), el conjugado de la subunidad B de la toxina del cólera (CTb) con la HRP, y el conjugado de la *Bandeiraea simplicifolia* isolectina B4 (IB4) con la HRP. Los conjugados WGA-HRP y CTb-HRP fueron preparados en nuestro laboratorio mediante el método del peryodato sódico de Nakane y Kawaoi (1974) con la modificación de McIlhinney *et al.* (1988). Por el contrario, la IB4-HRP empleada fue un conjugado comercial de la casa Sigma (L5391).

3.3.1. Técnica operatoria

Los cobayas fueron rasurados en la región de las vibrisas, previa anestesia mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (P3761, Sigma; 30-40 mg/Kg de peso). Transcurridos 30 minutos, se procedió a inyectar lentamente (durante 5 minutos) y en la región de las vibrisas izquierda el neurotrazador (WGA-HRP, CTb-HRP o IB4-HRP) mediante el empleo de una microjeringa Hamilton de 25µl (Tabla 3). Todos los neurotrazadores fueron disueltos en agua destilada la cual contenía un 2% de dimetilsulfóxido (DMSO, 102952, Merck).

COBAYA N°	PESO	NEUROTRAZADOR	DOSIS
035	600 g	WGA-HRP al 4%	20µl
036	675 g		
037	750 g	CTb-HRP al 4%	15µl
038	600 g		
039	800 g	IB4-HRP al 1%	25µl
040	650 g		

Tabla 3. Animales empleados para el estudio de las proyecciones trigeminales de la región de las vibrisas.

Una vez finalizada la inyección de los neurotrazadores, la microjeringa fue retirada y los animales fueron colocados en jaulas individuales durante todo el tiempo de supervivencia, permitiéndoseles tener libre acceso a comida y agua. El tiempo de supervivencia es de vital importancia para obtener el rendimiento óptimo del neurotrazador. Tanto con la WGA-HRP como con la CTb-HRP y la IB4-HRP se han utilizado tiempos relativamente cortos (45-47 horas) para evitar un marcaje adicional por transporte transneuronal.

3.3.2. Perfusión. Fijación. Almacenamiento y sección de los bloques de tejido nervioso

La fijación del tejido nervioso y el posterior lavado del mismo con tampón constituyen dos etapas cruciales cuando se utilizan trazadores enzimáticos tales como WGA-HRP, CTb-HRP e IB4-HRP (Rosene y Mesulam, 1978).

La solución fijadora ideal además de conservar los tejidos adecuadamente y de permitir realizar estudios con microscopía óptica y electrónica de transmisión (Segade *et al.*, 1980); cuando se emplean trazadores enzimáticos también debe estabilizar y preservar la actividad peroxidásica exógena (Segade *et al.*, 1980) así como inhibir la actividad peroxidásica endógena evitando la aparición de falsos positivos, sin afectar considerablemente la actividad peroxidásica exógena (Wong-Riley, 1976).

Los pioneros en el transporte de la HRP (Kristensson y Olsson, 1971; Kristensson *et al.*, 1971) emplearon la mezcla fijadora propuesta por Graham y Karnovsky (1966), constituida por glutaraldehído al 5% y paraformaldehído al 4%. Sin embargo, aunque algunos investigadores han obtenido resultados relativamente satisfactorios con el uso de paraformaldehído al 4% (Lynch *et al.*, 1974; Keefer, 1978), se ha dicho que este aldehído produce una clara disminución de la actividad enzimática de la HRP exógena (Jones y Leavitt, 1974; Malmgren y Olsson, 1978), lo que ha conllevado que se haya propuesto un uso discreto de paraformaldehído (0,4% en el caso de Jones y Leavitt, 1974), el empleo de soluciones fijadoras sólo con glutaraldehído (Adams, 1977; Malmgren y Olsson, 1978), o la supresión de la fijación del tejido nervioso (Courville y Saint-Cyr, 1978). Esta última alternativa presenta los inconvenientes de que favorece la difusión de la HRP en los tejidos nerviosos (Segade *et al.*, 1980; Mesulam, 1982), complica su detección al favorecer la reacción positiva de

las peroxidasas endógenas y dificulta en gran medida la manipulación de los cortes, puesto que se desgarran con facilidad. Por todo ello, la técnica de Courville y Saint-Cyr ha sido desestimada.

La mezcla fijadora más usada ha sido la de Sotelo y Palay, sugerida inicialmente por LaVail y LaVail (1972), la cual está formada por paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato o cacodilato 0,1M y pH 7,2-7,6. Para evitar en lo posible la disminución de la actividad peroxidásica, Rosene y Mesulam (1978) introdujeron un nuevo método de perfusión, que consistía en lavar durante 30 minutos, después de introducir durante otros 30 minutos el fijador de Sotelo y Palay, el árbol vascular con una solución de sacarosa al 10% en tampón fosfato 0,1M y pH 7,2. Este lavado eliminaría el exceso de aldehídos del tejido nervioso y serviría de crioprotector al contener sacarosa (Rosene y Mesulam postularon su procedimiento para tejidos nerviosos que se iban a cortar por congelación). La técnica de Rosene y Mesulam elimina el paso de postfijación que antes se empleaba después de la perfusión, evitando el tratamiento prolongado de los bloques de tejido nervioso.

En nuestro laboratorio se ha comprobado, a diferencia de lo que antiguamente se creía (Segade *et al.*, 1990), que la postfijación no siempre es necesaria para obtener una consistencia adecuada que permita seccionar el tejido nervioso en el vibratomo, siendo ésta la actitud adoptada en el presente trabajo tal y como se menciona posteriormente.

La fijación de los tejidos a bajas temperaturas para la demostración de la HRP ya fue sugerida por Straus (1964). Igualmente, en los estudios de Adams (1977), LaVail (1978) y Malmgren y Olsson (1978) también se ha recomendado la postfijación a bajas temperaturas. Nuestras experiencias han demostrado que en los bloques de tejido nervioso y en las secciones obtenidas en el vibratomo la actividad HRP disminuye considerablemente si se dejan más de 3 horas a temperatura ambiente.

a) Perfusión

La técnica de perfusión utilizada no difiere de la descrita en los animales donde se estudió la inmunorreactividad de c-fos (apartado 3.4.3.b) a excepción de las soluciones fijadoras empleadas. En el caso de los cobayas a los que se les inyectaron los trazadores neuroanatómicos, las soluciones fijadoras utilizadas fueron las siguientes:

- i) Solución fijadora A: Paraformaldehído (104005, Merck) al 1% y glutaraldehído (820603, Merck) al 1,25% en tampón fosfato salino 0,1M pH 7,4.
- ii) Solución fijadora B: Paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato salino 0,1M pH 7,4.

Una vez administrada la solución salina fisiológica, los cobayas fueron perfundidos durante 35 minutos con 1,4 litros de la solución fijadora A a una temperatura de unos 4°C, los cuales fueron seguidos por 300 ml de la solución fijadora B también a 4°C, aplicada durante 15 minutos. Finalmente, y tras la administración de las soluciones fijadoras se procedió a efectuar un nuevo lavado del árbol vascular con PBS a 4°C durante 20 minutos, para eliminar el exceso de aldehídos del tejido nervioso.

b) Extracción del encéfalo y médula espinal: postfijación

Los bloques de tejido nervioso empleados para el estudio de las proyecciones, una vez extraídos, y a diferencia de lo efectuado en el estudio de la inmunorreactividad de c-fos (apartado 3.4.3.c), fueron directamente almacenados en PBS a 4°C durante 12 horas-2 días, sin realizar postfijación de los mismos. Durante esta fase, es de suma importancia controlar la temperatura del frigorífico para que se mantenga en el límite mencionado, puesto que si la temperatura es superior a 4°C la actividad enzimática de la HRP disminuye considerablemente pudiendo incluso quedar totalmente inhibida; mientras que si la temperatura es inferior a 0°C el bloque se congela, con la consiguiente vacuolización del tejido nervioso ocasionada por los cristales que se forman, haciéndolo inservible por la pobre morfología que exhibiría.

El lavado en tampón después de la fijación ya fue recomendado por la escuela de LaVail (1972, 1973, 1974, 1978), sugiriendo que de esta forma se eliminaría el exceso de aldehídos y se recuperaría la actividad peroxidásica de la HRP, al suponer que el efecto inhibitor de los aldehídos sobre dicha enzima es reversible. Rosene y Mesulam (1978) demostraron, sin embargo, que la técnica de introducir el tampón directamente en el árbol vascular era más efectiva y que la actividad peroxidásica no se recuperaba después de un prolongado lavado en la solución tampón. Por otro lado, Malmgren y Olsson (1978) no recomendaban prolongar el lavado en tampón durante un periodo superior a 12-24 horas. Otros estudios también demostraron que un lavado en tampón inferior a 24 horas no disminuía la actividad peroxidásica (Mesulam, 1978, 1981;

Segade, 1987). En nuestro laboratorio se ha observado que la permanencia de los bloques en la solución tampón a bajas temperaturas incluso durante más de 2 días no disminuye la capacidad de visualizar el transporte transganglionar en el sistema trigeminal del cobaya (Segade *et al.*, 1990). Estos resultados están en línea con los de Mesulam (1982), en los que se señala que la actividad peroxidásica no disminuye al menos en los 7 primeros días de permanencia de los bloques de tejido nervioso en la solución tampón fosfato a bajas temperaturas. Incluso este autor ha comprobado que después de la permanencia de los bloques en la solución tampón hasta 2 meses, la actividad peroxidásica se demuestra de modo similar a un tiempo mucho más corto.

c) Sección de los bloques de tejido nervioso

La sección de los bloques de tejido nervioso fue efectuada de la misma forma que en el análisis inmunohistoquímico (apartado 3.4.3.d), con las siguientes modificaciones: i) las secciones transversales fueron cortadas con un espesor de 100 μ m; ii) el baño del vibratomo así como las cubetas donde fueron almacenadas las secciones fueron llenadas con agua destilada y no con PBS, en un intento por minimizar el contacto con sustancias tamponadas las cuales producen una pérdida en menos tiempo del precipitado. En cualquier caso, los cortes permanecieron en agua destilada un máximo de 2 horas con la finalidad de evitar una importante disminución de la actividad enzimática de la HRP.

3.3.3. Demostración histoquímica de los neurotrazadores enzimáticos

La técnica histoquímica empleada ha sido la misma en los tres neurotrazadores inyectados, la cual consiste en demostrar la actividad peroxidásica de la HRP. Por ello y para obtener un buen rendimiento, se han adoptado las medidas anteriormente descritas destinadas a evitar una disminución significativa de la actividad enzimática de dicha sustancia. La sensibilidad del método, igualmente depende del cromógeno elegido y de todos los parámetros que afectan al período de incubación enzimática.

La visualización de las neuronas marcadas en el sistema nervioso central se ha realizado mediante el empleo del cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), que reúne las características idóneas para demostrar las peroxidases y, en particular, la HRP. Esta

sustancia fue introducida en la histoquímica moderna por Holland *et al.* (1974), que la utilizaron para demostrar la presencia de hemoglobina en los glóbulos rojos. Posteriormente, fue propuesta como cromógeno para la histoquímica de la HRP por Hardy y Heimer (1977), y por Mesulam y Rosene (1977). Estos dos primeros procedimientos no consiguieron un alto rendimiento porque, por una parte, con el método de Hardy y Heimer (1977) la sensibilidad era a lo sumo igual al método de la benzidina de Mesulam (1976), mientras que con el propuesto por Mesulam y Rosene (1977) se formaban excesivos artefactos cristalinos que complicaban la detección de la HRP. Mesulam (1978) analizó con detalle todos los parámetros que influían en la reacción histoquímica empleando la TMB como cromógeno y el nitroprusiato de sodio como estabilizante, y de este modo propuso un método de gran sensibilidad. El éxito del procedimiento de Mesulam (1978) consiste en emplear la adecuada concentración de TMB, de nitroprusiato de sodio y de peróxido de hidrógeno, y realizar la incubación enzimática a un pH de 3,3-3,7. Las modificaciones posteriores al método de Mesulam han discurrido en el sentido de mejorar la estabilidad del precipitado y de adaptar el material tanto para la microscopía óptica como para la microscopía electrónica de transmisión. El procedimiento histoquímico que se describe a continuación constituye una modificación del método original de Mesulam (1978). Las variantes introducidas han sido: la sustitución de etanol por dimetilsulfóxido para disolver el TMB (Segade, 1980), la reducción de la concentración de nitroprusiato de sodio a 0,06% (Mesulam, 1982) y la de peróxido de hidrógeno a 0,0075%, la incubación en la oscuridad (Mesulam, 1981), el prolongamiento del tiempo de incubación, la estabilización de las secciones secadas al aire con salicilato de metilo (Adams, 1980), y, finalmente su almacenamiento en frío (Kalia y Welles, 1980). Los portaobjetos preparados en nuestro laboratorio siguiendo este método han permanecido intactos durante 2-3 años, sin que ellos se apreciase ningún deterioro, mientras que los que fueron preparados por otras técnicas (Mesulam, 1978, 1981, 1982) su vida media no ha sido superior a la de pocos meses. Esto probablemente es debido al reemplazamiento del etanol por DMSO, debido a que el alcohol desestabiliza el producto de reacción azul incluso a bajas concentraciones. Esta técnica ya ha sido descrita por Segade (1987) y Segade *et al.* (1990).

a) Soluciones**Solución de preincubación:**

- | | |
|---|--------|
| • TMB (T2885, Sigma) | 10 mg |
| • DMSO | 2 ml |
| • Nitroprusiato de sodio (106541, Merck) | 120 mg |
| • Tampón CIH/acetato sódico 0,05 M pH 3,3 | 200 ml |

Se disuelve el TMB en el DMSO, y el nitroprusiato de sodio en el tampón CIH/acetato sódico. A continuación ambas soluciones son mezcladas inmediatamente antes de ser utilizadas, obteniéndose una disolución de pH 3,7 aproximadamente.

Solución de incubación:

Se elabora de la misma forma que la solución de preincubación, pero a la que a mayores se le añaden 5 ml de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 0,3%. Esta solución de peróxido de hidrógeno se prepara mezclando 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30% con 99 ml de agua destilada. El peróxido de hidrógeno al 0,3% debe añadirse, al igual que ocurre con el DAB, segundos antes de iniciar la incubación enzimática. La adición del peróxido de hidrógeno induce un cambio de color del baño de incubación, pasando de una tonalidad amarillenta a verdosa.

b) Procedimiento

- Preincubar las secciones durante 20 minutos, en la oscuridad y a 20-25°C.
- Incubar las secciones durante 20-40 minutos, también en la oscuridad y a 20-25°C.
- Lavar en agua destilada, debiendo pincelar las secciones para eliminar posibles artefactos.
- Recoger las secciones en portaobjetos pretratados con gelatina (104078, Merck) al 1% y dejar secar al aire.
- Una vez secas, sumergir durante unos minutos en salicilato de metilo (106070, Merck), aclarar con xileno (el tiempo necesario para que desaparezcan las burbujas de aire que acostumbran a quedar en los vasos sanguíneos) y poner los cubreobjetos utilizando como resina de montaje Entellan.
- Tras el secado de la resina (30-60 minutos), almacenar los portaobjetos a una temperatura de 2-4°C.

3.4. Estimulación química nociceptiva

La inducción de inmunorreactividad de c-fos como consecuencia de la aplicación de estímulos de naturaleza química tales como factores tróficos (Sharp *et al.*, 1989a), solución salina hipertónica (Sharp *et al.*, 1991) y fármacos convulsivantes (Popovici *et al.*, 1988), entre otros (Sonnenberg *et al.*, 1989b; Dragunow y Faull, 1990), ha sido frecuentemente empleada para determinar la activación de neuronas centrales de segundo orden o de un orden superior.

3.4.1. Sustancias químicas nocivas utilizadas

En el presente trabajo, los compuestos químicos empleados con la finalidad de inducir un estímulo nociceptivo capaz de propiciar la expresión de c-fos en el sistema nervioso central del cobaya fueron: la capsaicina, la formalina, el aceite de mostaza, y dos fármacos GABAérgicos: el baclofeno y el faclofeno. Por otra parte, las dos ratas utilizadas para establecer comparaciones con la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya únicamente fueron estimuladas con el aceite de mostaza.

a) Capsaicina

La capsaicina, el principio activo de los pimientos picantes del género *Capsicum*, es un derivado químico de la amida vanillil (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) y cuyo peso molecular es 305,42 g/mol (Holzer, 1991). Aunque este compuesto fue aislado por primera vez en 1846 (Thresh, 1846), su estructura química no fue determinada hasta 1919 (Nelson, 1919), realizándose su síntesis completa una década más tarde (Spath y Darling 1930).

Las acciones de la capsaicina principalmente son debidas a la activación de un receptor específico situado en la membrana de las células sensibles a dicha sustancia: el receptor vaniloide subtipo 1 (Caterina *et al.*, 1997); sin embargo, también se le han atribuido otros efectos no mediados por este receptor, tales como inhibición de sistemas enzimáticos (Shimomura *et al.*, 1989; Wolvetang *et al.*, 1996), inducción de la

formación de pseudocanales en las bicapas lipídicas (Feigin *et al.*, 1995), alteración de la fluidez de la membrana (Meddings *et al.*, 1991; Aranda *et al.*, 1995) y bloqueo de los canales de potasio (Castle, 1992; Kuenzi y Dale, 1996). El receptor vaniloide subtipo 1 (VR1), un miembro de la familia de canales iónicos excitadores TRP (Clapham, 2003), es permeable a diversos cationes monovalentes, aunque muestra una notable preferencia por cationes divalentes (Caterina *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1988, 1989), siendo la secuencia de permeabilidad la siguiente: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$ (Szallasi y Blumberg, 1999), de ahí que dicho receptor sea definido como un canal catiónico no selectivo con preferencia por el calcio (Bevan y Szolcsányi, 1990). Además de la capsaicina (Caterina *et al.*, 1997) y otros agentes vaniloides (Szallasi y Blumberg, 1999; Liu *et al.*, 2000), el calor nocivo (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998) y el pH bajo (Bevan y Yeats, 1991; Bevan y Geppetti, 1994) también activan el VR1. Asimismo, los protones (pH ácido) pueden actuar como agentes moduladores, potenciando los efectos provocados por el calor (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998) así como por la capsaicina (Petersen y LaMotte, 1993; Kress *et al.*, 1996), al disminuir el umbral necesario para la activación del canal por dichos agonistas. De hecho, en concentraciones moderadamente ácidas ($\text{pH} \leq 5,9$), la temperatura ambiente es capaz de activar el canal (Tominaga *et al.*, 1998), de la misma forma que una reducción del pH de 7,6 a 6,3 el cual no es capaz de abrir el VR1, produce un aumento (de hasta 5 veces) en la amplitud de la corriente provocada por la capsaicina (Caterina *et al.*, 1997).

Hasta hace pocos años se creía que el VR1 estaba presente de manera exclusiva en neuronas sensitivas primarias (Szallasi y Blumberg, 1990; Szallasi *et al.*, 1993, 1994), tanto en su soma como en sus procesos central y periférico (Szallasi, 1995; Guo *et al.*, 1999); sin embargo, hoy en día se sabe que aunque tiene preferencia por este tipo de neuronas, varios núcleos del cerebro [p.ej. núcleos basales (Sasamura *et al.*, 1998), hipotálamo (Ács *et al.*, 1996; Sasamura *et al.*, 1998) y formación reticular (Ács *et al.*, 1996)], así como tejidos no neuronales, tales como mastocitos (Bíró *et al.*, 1998b), queratinocitos epidérmicos (Inoue *et al.*, 2002) y células gliales (Bíró *et al.*, 1998a), también expresan el VR1. Las neuronas aferentes primarias sensibles a la capsaicina únicamente incluyen ciertas subpoblaciones neuronales, las cuales suelen corresponderse con neuronas peptidérgicas, siendo la sustancia P la que presenta la mejor correlación con la sensibilidad a la capsaicina (Buck y Burks, 1986; Holzer, 1991), de pequeño o mediano diámetro (neuronas de tipo B) (Sugimoto *et al.*, 1998c;

Guo *et al.*, 1999) y provistas de un axón amielínico delgado (Marsh *et al.*, 1987; Jancsó y Lawson, 1990), principalmente del tipo de las fibras nociceptivas polimodales (Konietzny y Hensel, 1983; Szolcsányi, 1987). Sin embargo, debe ser enfatizado que no todas las neuronas sensitivas que reúnen las características anteriormente citadas son sensibles a la capsaicina, de la misma forma que también se ha comprobado que algunas neuronas de diámetro grande y axón mielinizado delgado (fibras A δ) conectadas a nociceptores polimodales (Szolcsányi *et al.*, 1988; Hartung *et al.*, 1989; Ikeda *et al.*, 1997), así como algunas neuronas con axón amielínico tipo C conectadas a receptores del calor (Foster y Ramage, 1981; Szolcsányi, 1983), pueden ser estimuladas por la capsaicina; lo que ha llevado a Holzer (1988, 1991) a concluir que las neuronas aferentes primarias sensibles a la capsaicina son una población neuronal morfológica, neuroquímica y funcionalmente heterogénea.

Tras un primer contacto con la capsaicina en bajas dosis (en el rango de $\mu\text{g}/\text{Kg}$) o concentraciones (en el rango de nM - μM), las neuronas aferentes son **estimuladas** durante un corto período de tiempo (p.ej. Konietzny y Hensel, 1983; Szolcsányi, 1987; Szolcsányi *et al.*, 1988). Esta excitación neuronal conlleva no sólo la generación de una sensación dolorosa (Szolcsányi y Jancsó-Gábor, 1975; Geppetti *et al.*, 1988b) así como la activación de reflejos protectores tales como estornudos, tos y broncoconstricción en respuesta a la irritación de la vía aérea (Lundberg y Saria, 1987; Geppetti *et al.*, 1988b), sino también una liberación de neurotransmisores (p.ej. sustancia P) desde las terminaciones nerviosas sensitivas periféricas activadas (Jessell *et al.*, 1978; Gamse *et al.*, 1980), permitiéndoles a estas neuronas ejercer una función efectora local (Holzer, 1988), debido a que estas sustancias influyen en diversas funciones tisulares locales, tales como cambios en la permeabilidad vascular o en la actividad del músculo liso (Lundberg *et al.*, 1984). Después de la estimulación inicial, la capsaicina produce una **desensibilización** de las neuronas aferentes primarias, la cual puede persistir desde unas pocas horas (Szolcsányi, 1983; Szolcsányi *et al.*, 1975) hasta algunos días (Hayes *et al.*, 1981; Bittner y Lahann, 1984), así como un **bloqueo de la conducción** (Pini, 1983; Chung *et al.*, 1985; Baranowski *et al.*, 1986; Such y Jancsó, 1986). La exposición de estas neuronas sensitivas a dosis relativamente bajas de capsaicina las vuelve refractarias únicamente a posteriores aplicaciones de la misma o sus congéneres (Dray *et al.*, 1989; Winter *et al.*, 1990), mientras que dosis mayores pueden conllevar una pérdida de la respuesta también a estímulos mecánicos nocivos (Szolcsányi, 1987; He *et*

al., 1990) y térmicos (Szolcsányi, 1983, 1987) así como a otras sustancias químicas (Szolcsányi, 1987; He *et al.*, 1990). A los pocos minutos de la administración de capsaicina perineural se produce un bloqueo de la conducción (Pini, 1983; Baranowski *et al.*, 1986; Such y Jancsó, 1986). Este bloqueo, en el hurón (Baranowski *et al.*, 1986) en el mono (Chung *et al.*, 1985) y en el gato (Such y Jancsó, 1986) únicamente se observa en fibras aferentes delgadas, mientras que en la rata (Pini, 1983; Baranowski *et al.*, 1986), en el conejo y en el cobaya (Baranowski *et al.*, 1986) afecta tanto a fibras aferentes C y A δ como A $\alpha\beta$, siendo las fibras C del cobaya y el conejo menos sensibles a la inhibición de la conducción que las de la rata (Baranowski *et al.*, 1986). Pese a que la desensibilización y el bloqueo de la conducción son las consecuencias más comunes de la acción excitadora inicial de la capsaicina, en algunas ocasiones y previamente a la aparición de éstas, también es posible observar un aumento de la sensibilidad a estímulos térmicos (Kenins, 1982; Konietzny y Hensel, 1983), mecánicos (Kenins, 1982) y químicos (Green, 1989) nocivos, principalmente cuando se administran dosis bajas de capsaicina reiteradamente. La administración de altas dosis de capsaicina (en el rango de mg/kg) tiene un claro efecto **neurotóxico** en neuronas aferentes sensitivas, dependiendo la severidad del daño ocasionado de la dosis, de la especie animal, de la edad y de la vía de administración. El tratamiento sistémico de ratas recién nacidas con una única dosis de capsaicina de 50 mg/Kg produce una degeneración permanente que oscila desde aproximadamente el 65% (Jancsó *et al.*, 1977, 1980; Scadding, 1980) al 95% (Nagy *et al.*, 1981,1983) de todas las fibras aferentes amielínicas, sin que se produzca ningún cambio importante en aferentes mielinizadas. Sin embargo, con dosis mayores de 50 mg/Kg, también se observa una reducción [entre el 10% (Jancsó *et al.*, 1980) y el 40% (Nagy *et al.*, 1983)] en las fibras mielinizadas de pequeño calibre. La aplicación de 35 a 300 mg/Kg de capsaicina a ratas adultas produce efectos menos pronunciados que en recién nacidas, observándose bien ninguna (Joó *et al.*, 1969; Szolcsányi *et al.*, 1975) o solamente una parcial (Jancsó *et al.*, 1985) degeneración de neuronas aferentes de tipo B. Por el contrario, en cobayas adultas, cuyas neuronas aferentes de pequeño calibre (Buck *et al.*, 1983) son ligeramente más sensibles a la acción neurotóxica de la capsaicina sistémica que aquellas de ratas recién nacidas (Nagy *et al.*, 1983), una dosis de 50 mg/Kg causa una rápida degeneración de fibras no mielinizadas (Papka *et al.*, 1984). La degeneración de neuronas sensitivas ocasionada por la capsaicina conlleva la aparición de déficits neuroquímicos. La depleción de la sustancia P en tractos sensitivos de ratas adultas es observada tras la administración

subcutánea o intraperitoneal de 50-125 mg/Kg de capsaicina (Gamse *et al.*, 1981; Gamse, 1982), siendo la vía intraperitoneal más efectiva que la subcutánea (Gamse *et al.*, 1981).

Las acciones ejercidas por la capsaicina en neuronas sensitivas aferentes, han estimulado el empleo de esta sustancia como agente analgésico para el tratamiento del dolor en afecciones tales como la cefalea acuminada (Fusco *et al.*, 1991), la neuralgia postherpética (Watson *et al.*, 1988), la neuropatía diabética (Scheffler *et al.*, 1991), el síndrome post-mastectomía (Dini *et al.*, 1993), la osteoartritis y artritis reumatoide (Deal *et al.*, 1991), el síndrome de Guillain-Barré (Morgenlander *et al.*, 1990) y el síndrome de boca ardiente (Huang *et al.*, 1996), entre otras (Szallasi y Blumberg, 1999).

Las especies no mamíferas presentan baja sensibilidad a la acción de la capsaicina. La administración sistémica o local de esta sustancia en palomas y otros pájaros no provoca o bien sólo es ligeramente activa a la hora de inducir dolor o reacciones nociceptivas (Mason y Maruniak, 1983; Szolcsányi *et al.*, 1986; Sann *et al.*, 1987), de la misma forma que los anfibios son insensibles a los efectos neurotóxicos de la capsaicina (Chéry-Croze *et al.*, 1985). Por el contrario, la capsaicina actúa como un estimulante de neuronas sensitivas de pequeño calibre en numerosas especies de mamíferos, entre las que se incluyen los humanos, la rata, el ratón, el cobaya, el hámster, el conejo, el gato, el perro, la cabra (Glinsukon *et al.*, 1980; Szolcsányi, 1990), el cerdo (Pierau y Szolcsányi, 1989; Alving *et al.*, 1991) y el oso (Rogers, 1984), pese a que se ha visto que existen importantes diferencias de especie en la susceptibilidad de neuronas aferentes a la acción de la capsaicina. Por ejemplo, en el conejo, la aplicación de capsaicina a fibras nerviosas aferentes no conlleva ninguna degeneración axónica (Lynn y Shakhaneh, 1988), mientras que una gran proporción de fibras C de la rata degeneran tras la administración de la misma (Jancsó y Lawson, 1990; Pini *et al.*, 1990). Igualmente, las acciones de la capsaicina presentan discrepancias asociadas con la edad y el linaje. El grado de depleción peptídica producida en neuronas sensitivas de ratas Wistar es la misma cuando la capsaicina es dada a ratas recién nacidas que adultas (Geppetti *et al.*, 1988a), mientras que el tratamiento en ratas Sprague-Dawley recién nacidas es más efectivo que en adultas (Gamse *et al.*, 1981).

b) Formalina

La formalina, un irritante químico cuya administración se asocia con la aparición de lesión tisular (Clavelou *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 2001), inflamación (Brown *et al.*, 1968; Rosland *et al.*, 1990; Wheeler-Aceto *et al.*, 1990) y dolor (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Luccarini *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004), ha sido extensamente utilizada como estímulo nocivo en varias especies animales, tales como la rata (Dubuisson y Dennis, 1977; Okamoto *et al.*, 2004), el gato (Dubuisson y Dennis, 1977; Chen *et al.*, 1996), el ratón (Hunskaar *et al.*, 1985; Hunskaar y Hole, 1987; Murray *et al.*, 1988; Kolesnikov *et al.*, 2004), el cobaya (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991) y el mono (Alreja *et al.*, 1984).

La inyección subcutánea de formalina constituye un modelo experimental animal de dolor inflamatorio moderado y persistente conocido como el test de la formalina (Dubuisson y Dennis, 1977; Murray *et al.*, 1988; Tjølsen *et al.*, 1992). Dicho test ha sido ampliamente utilizado para estudiar diversos estados dolorosos y sus patofisiologías subyacentes (Coderre y Melzack, 1992a,b; Okamoto *et al.*, 2004) así como para evaluar acciones antinociceptivas de fármacos analgésicos (Hunskaar *et al.*, 1985; Luccarini *et al.*, 2004), dado que imita algunas de las características del dolor inflamatorio en humanos (Clavelou *et al.*, 1995), lo que le convierte en un modelo clínicamente más adecuado que otros test que inducen un dolor fásico de intensidad umbral (Tjølsen *et al.*, 1992).

Investigaciones de análisis de comportamiento han mostrado que tanto el test de la formalina original (Coderre y Melzack, 1992a,b; Tjølsen *et al.*, 1992; Cadet *et al.*, 1998), es decir, aquel en el que la formalina es inyectado subcutáneamente en la pata posterior de animales de experimentación, como las diferentes variantes que se han hecho de dicho test, tales como el test de la formalina orofacial cutáneo (Clavelou *et al.*, 1989, 1995; Eisenberg *et al.*, 1996; Cadet *et al.*, 1998) y profundo (Roveroni *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2004, 2005) así como el test de la formalina de la cola (Kolesnikov *et al.*, 2004), inducen una serie de reacciones nociceptivas que en conjunto constituyen la denominada “conducta relacionada con el dolor”. La conducta relacionada con el dolor es, generalmente, una respuesta bifásica motora caracterizada por presentar un periodo de actividad inmediato (a los pocos segundos) y de corta duración (3-5 minutos) observado inmediatamente tras la inyección (primera fase), y el

cual tras una fase de relativa inactividad (5-10 minutos) es seguido por una respuesta más tardía (a los 10-15 minutos) y prolongada, de aproximadamente 20-40 minutos (segunda fase) (Dubuisson y Dennis, 1977; Clavelou *et al.*, 1989; Coderre y Melzack, 1992b). Estos dos componentes de la respuesta inducida por la formalina se ha visto que están relacionados con las dos modalidades de sensibilidad nociceptiva: aguda/fásica y crónica/tónica, respectivamente (Dennis y Melzack, 1979; Eisenberg *et al.*, 1996).

La fase temprana y transitoria que se produce inmediatamente tras la inyección de formalina, se debe a una activación directa de los nociceptores periféricos mielinizados y no mielinizados por la formalina (Dubuisson y Dennis, 1977). La fase tónica tardía depende igualmente de la conducción en fibras aferentes primarias, especialmente fibras C (Dallel *et al.*, 1995; Puig y Sorkin, 1995; Taylor *et al.*, 1995; McCall *et al.*, 1996), así como de la inflamación tisular periférica que se desarrolla en el lugar de la inyección (Dubuisson y Dennis, 1977; Tjølsen *et al.*, 1992; Eisenberg *et al.*, 1996) y de cambios inducidos por la actividad neuronal generada en la primera fase en el sistema nervioso central (es decir, sensibilización central) (Dickenson y Sullivan, 1987b; Coderre *et al.*, 1990, 1993) y en los cuales están implicados amino ácidos excitadores, la sustancia P y los receptores correspondientes (Haley *et al.*, 1990; Coderre, y Melzack, 1992a; Wiertelak *et al.*, 1994; Woolf, y Doubell, 1994). El periodo inactivo es el resultado de una inhibición de la transmisión nociceptiva mediada por la activación de los receptores GABA_A mediante el neurotransmisor GABA (ácido gammaaminobutírico), el cual es liberado 10 minutos tras de la inyección de formalina (Kaneko y Hammond, 1997).

Los comportamientos nociceptivos inducidos por la formalina son sensibles a cambios en la temperatura ambiente (Rosland, 1991; Hole y Tjølsen, 1993; Abbott *et al.*, 1995), a la edad (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991), a determinados anestésicos (O'Connor y Abram, 1995; Taylor *et al.*, 1997) así como a sustancias que deprimen la actividad motora (Rosland *et al.*, 1987; Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Jourdan *et al.*, 1997) y a nuevas situaciones medioambientales y/o de evaluación (Tjølsen *et al.*, 1992; Harris y Westbrook, 1994; Abbott *et al.*, 1995). Además, el nivel de estrés del animal (Fanselow, 1985; Abbott *et al.*, 1986), el lugar de inyección (Raboisson y Dallel, 2004), la especie (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991) e incluso el linaje (Abbott *et al.*, 1995) pueden influenciar dichas respuestas. Pese a que el test de la formalina es un modelo fiable para el estudio de la nocicepción, especialmente si se emplea una combinación de varios comportamientos antes que cualquier reacción individual (Tjølsen *et al.*, 1992;

Coderre *et al.*, 1993; Abbott *et al.*, 1995; Roveroni *et al.*, 2001), siempre que se realicen estudios farmacológicos o fisiológicos, los factores anteriormente citados deben ser controlados con el fin de evitar una disminución en la sensibilidad del test y de esta forma prevenir un enmascaramiento de los efectos de la droga que esté siendo evaluada.

La formalina también ha sido utilizada como estímulo nocivo en investigaciones electrofisiológicas (p.ej. Dickenson y Sullivan, 1987a,b; Haley *et al.*, 1989, 1990; Raboisson *et al.*, 1991, 1995), observándose que tanto neuronas nociceptivas específicas (Raboisson *et al.*, 1991) como neuronas de límite vasto y dinámico (Banna *et al.*, 1986; Dickenson y Sullivan, 1987a,b; Haley *et al.*, 1989, 1990; Sotgiu, 1989; Raboisson *et al.*, 1991, 1995; Porro y Cavazzuti, 1993) del asta dorsal de la médula espinal (Banna *et al.*, 1986; Dickenson y Sullivan, 1987a,b; Haley *et al.*, 1989, 1990; Pertovaara y Tukeva, 1989; Sotgiu, 1989; Porro y Cavazzuti, 1993) y del núcleo espinal trigeminal (Raboisson *et al.*, 1991, 1995) son excitadas tras la inyección de formalina. Sin embargo, la actividad inducida por la formalina en neuronas nociceptivas se caracteriza por presentar un perfil heterogéneo: mientras que en algunas la respuesta es monofásica (Banna *et al.*, 1986; Pertovaara y Tukeva, 1989; Raboisson *et al.*, 1991, 1995), en otras se observa un aumento de doble pico en sus descargas neuronales (Banna *et al.*, 1986; Dickenson y Sullivan, 1987a,b; Haley *et al.*, 1989, 1990; Sotgiu, 1989; Raboisson *et al.*, 1991, 1995), el cual se correlaciona desde el punto de vista temporal con las reacciones bifásicas de comportamiento (Dickenson y Sullivan, 1987b; Sotgiu, 1989; Raboisson *et al.*, 1991). El estudio de las respuestas de neuronas nociceptivas a la administración de formalina ha contribuido a esclarecer qué núcleos están implicados en el procesamiento de cada una de las dos modalidades de sensibilidad nociceptiva (Raboisson *et al.*, 1995).

c) Aceite de mostaza

El aceite de mostaza (isotiocianato de alilo), un potente irritante químico (Szolcsányi, 1977), es el principio pungente de diversas plantas del género *Brassica* (p.ej. *B. nigra*, *B. juncea*) (Bánvölgyi *et al.*, 2004) y el cual ha sido ampliamente utilizado, junto con la capsaicina (Holzer, 1988), para inducir reacciones inflamatorias bajo condiciones experimentales (Reeh *et al.*, 1986; Louis *et al.*, 1989; Lippe *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997; Bester *et al.*, 1998; Pintér *et al.*, 1999; Bánvölgyi *et al.*, 2004).

Este compuesto media sus efectos a través de la activación del receptor ANKTM1 (Jordt *et al.*, 2004), un canal iónico no selectivo permeable al calcio que, al igual que el VR1, pertenece a la familia de canales excitadores TRP (Clapham, 2003) y puede ser bloqueado por el rojo de rutenio (Story *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2004), un inhibidor no específico del VR1 (Szallasi y Blumberg, 1999). El receptor ANKTM1 interviene en la termosensación, concretamente, es activado por estímulos térmicos inferiores a 20°C, de ahí que se defina como un detector del frío nocivo (Story *et al.*, 2003).

El aceite de mostaza estimula una subpoblación de neuronas sensitivas primarias peptidérgicas (p.ej. CGRP- o sustancia P-inmunorreactivas) (Story *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2004) nociceptivas polimodales (Reeh *et al.*, 1986; Fitzgerald, 1987), principalmente provistas de axones amielínicos (fibras C) (Reeh *et al.*, 1986; Woolf y Wall, 1986; Fitzgerald, 1987; Story *et al.*, 2003), pero también mielinizados de pequeño calibre (fibras A δ) (Harris y Ryall, 1988; Story *et al.*, 2003), siendo muchas de ellas también sensibles a la capsaicina (Woolf y Wall, 1986; Story *et al.*, 2003; Bánvölgyi *et al.*, 2004; Jordt *et al.*, 2004). Particularmente se ha visto que el 97% (100/103) de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal que expresan el receptor ANKTM1 también presentan el VR1, mientras que el 30% (100/336) de las neuronas que expresan el VR1 también presentan el receptor ANKTM1 (Story *et al.*, 2003). Esta amplia colocación justifica la ausencia de efectos asociados al aceite de mostaza posteriormente a la realización de un pretratamiento con capsaicina en dosis suficientes para inducir degeneración neuronal (p.ej. Lippe *et al.*, 1993).

El aceite de mostaza aplicado tópicamente en la superficie cutánea activa terminaciones nerviosas sensitivas periféricas subyacentes, produciendo una sensación dolorosa quemante (Handwerker *et al.*, 1991), que es seguida por el desarrollo de una reacción inflamatoria (Reeh *et al.*, 1986; Louis *et al.*, 1989; Lippe *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997; Bester *et al.*, 1998; Pintér *et al.*, 1999; Bánvölgyi *et al.*, 2004) y por la aparición de sensibilización, caracterizándose esta última por cursar con hiperalgesia y alodinia (Koltzenburg *et al.*, 1992).

Aunque en un principio, en base a la ineffectividad del aceite de mostaza para inducir efectos inflamatorios en regiones cutáneas desnervadas (Jancsó *et al.*, 1967, 1977; Lippe *et al.*, 1993; Bester *et al.*, 1998), se creía que dicha sustancia únicamente inducía una respuesta inflamatoria de tipo neurogénico, actualmente se sabe que la

reacción inflamatoria está mediada tanto por mecanismos neurogénicos como no neurogénicos (Bánvölgyi *et al.*, 2004).

La neuroinflamación cursa con vasodilatación y un aumento en la permeabilidad vascular, que conlleva la extravasación de proteínas plasmáticas con la posterior formación de edema (Reeh *et al.*, 1986; Louis *et al.*, 1989; Lippe *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997; Bester *et al.*, 1998; Pintér *et al.*, 1999; Bánvölgyi *et al.*, 2004). Estos efectos son debidos a la acción de transmisores peptídicos vasoactivos (fundamentalmente sustancia P y CGRP) que son liberados desde terminaciones nerviosas periféricas sensibles a la capsaicina (Jancsó *et al.*, 1967, 1977; Louis *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1997; Gamse *et al.*, 1980), ya que el tratamiento con dosis neurotóxicas de capsaicina (Jancsó *et al.*, 1977; Lippe *et al.*, 1993; Holzer y Jocič, 1994; Inoue *et al.*, 1997), la cual produce una depleción de los péptidos presentes en dichas terminaciones (Holzer, 1991), o la administración de antagonistas de los receptores para dichos neuropéptidos (p.ej. SR 140333, un antagonista selectivo no peptídico del receptor NK₁) (Amann *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1997; Pintér *et al.*, 1999; Bánvölgyi *et al.*, 2004) previamente a la aplicación del aceite de mostaza, conllevan la ausencia de efectos inflamatorios. Concretamente, el componente exudativo de la respuesta inflamatoria es en gran medida justificado por la sustancia P (Lembeck y Holzer, 1979; Louis *et al.*, 1989; Lembeck *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 2000; Bánvölgyi *et al.*, 2004), el miembro más conocido de la familia de las taquicininas, al actuar mediante el receptor NK₁, frecuentemente situado en células endoteliales postcapilares (O'Flynn *et al.*, 1989; Guard y Watson, 1991; McDonald *et al.*, 1996) y al inducir la liberación de aminas vasoactivas desde mastocitos situados en cercana proximidad a espacios perivasculares (Erjavec *et al.*, 1981; Fewtrell *et al.*, 1982); mientras que la hiperemia, es mediada por la sustancia P (Lembeck y Holzer, 1979; Louis *et al.*, 1989) y por el CGRP (Brain *et al.*, 1985; Louis *et al.*, 1989), y también en parte por el óxido nítrico derivado de las células endoteliales (Lippe *et al.*, 1993), el cual es sabido que participa en la acción vasodilatadora de la sustancia P (Furchgott, 1984; Whittle *et al.*, 1989; Schini *et al.*, 1990), pero no en la hiperemia inducida por el CGRP (Ralevic *et al.*, 1992). El CGRP por sí mismo no produce extravasación de proteínas plasmáticas (Brain y Williams, 1985), sin embargo cuando es administrado conjuntamente con la sustancia P potencia el aumento de la permeabilidad inducido por esta taquicinina (Gamse y Saria, 1985; Louis *et al.*, 1989).

La administración repetitiva de aceite de mostaza da lugar a una reacción inflamatoria que cursa con cambios vasculares tardíos (edema sostenido) que son

seguidos por eventos celulares (acumulación de leucocitos), y los cuales son independientes de mecanismos neurogénicos, ya que no son inhibidos ni por el pretratamiento con capsaicina ni por el antagonista del receptor NK₁, SR140333, lo que excluye la participación de neuropéptidos sensitivos en dicha reacción (Bánvölgyi *et al.*, 2004).

d) Fármacos GABAérgicos

El GABA es el neurotransmisor inhibitor por excelencia del sistema nervioso central de los vertebrados, seguido por la glicina. Se ha estimado que este aminoácido es utilizado por lo menos por un 40% de las neuronas y por las células gliales (Burt y Kamatchi, 1991; Zorumski y Isenberg, 1991) y que aproximadamente un tercio de todas las sinapsis del sistema nervioso central son GABAérgicas (Gaillard, 1989).

El GABA inhibe la excitabilidad neuronal al actuar sobre dos clases de receptores: el receptor ionotrópico GABA_A o complejo receptor GABA_A (CRGA) y el receptor metabotrópico GABA_B, siendo la mayoría de los efectos inhibitorios rápidos de este neurotransmisor mediados por el receptor GABA_A y los inhibitorios lentos por el receptor GABA_B (Salazar, 2005).

El GABA al interactuar con el receptor GABA_A, induce la apertura de canales iónicos selectivos para el cloro, lo que conlleva un aumento de la conductancia hacia el interior de las neuronas que desencadena la hiperpolarización de la membrana postsináptica, resultando finalmente en una inhibición de su actividad (Roberts *et al.*, 1986; Sawynok, 1987). El CRGA es activado directamente por el muscimol, e inhibido competitivamente por la bicuculina, y no competitivamente por la picrotoxina (Takemura *et al.*, 2000b).

El receptor GABA_B comprende un lugar de reconocimiento y un canal iónico de calcio o de potasio, con los que está acoplado indirectamente mediante proteínas ligadoras de nucleótidos de guanina, también conocidas como proteínas G (Roberts *et al.*, 1986; Sawynok, 1987). En general, la activación del receptor GABA_B en neuronas periféricas, como las del ganglio raquídeo posterior, induce una reducción de la entrada de calcio en la célula, mientras que en el sistema nervioso central, como en el caso de las células piramidales del hipocampo, produce un aumento del flujo de potasio hacia el exterior de la neurona (Bittiger, 1989; Allan y Harris, 1989). Entre los antagonistas del

receptor GABA_B cabe destacar al faclofeno y entre los agonistas al baclofeno (Takemura *et al.*, 2001). Mientras que el faclofeno, y en general, todos los agentes que bloquean al GABA no tienen aplicación clínica porque generan convulsiones (Salazar, 2005); el baclofeno es de amplio uso en la clínica diaria como agente antiespástico, relajante muscular (Penn *et al.*, 1989) y antinociceptivo, especialmente en cuadros agudos o fásicos (Fromm y Terrence, 1987).

El sistema GABAérgico ha sido implicado en la etiopatogenia de diversas condiciones patológicas tales como los trastornos de la memoria (p.ej. enfermedad de Alzheimer), las encefalopatías metabólicas (de tipo hepático o urémico), la epilepsia, el dolor, la depresión, la esquizofrenia, la ansiedad, los trastornos del movimiento (p.ej. enfermedad de Parkinson) y del tono muscular (p.ej. espasticidad), los tumores cerebrales, el abuso de alcohol y de otras sustancias (p.ej. las benzodiazepinas), las alteraciones del sueño, la isquemia y edema cerebral, y las porfirias (Gaillard, 1989; Lloyd *et al.*, 1990; Burt y Kamatchi, 1991; Zorumski y Isenberg, 1991).

De especial interés resulta la sustancial evidencia que indica que el GABA está íntimamente implicado en la nocicepción a través de acciones ejercidas a niveles espinales (segmentales) y supraespinales (Roberts *et al.*, 1986; Sawynok, 1987). Sin embargo, los efectos de fármacos GABAérgicos en el procesamiento sensitivo varía de acuerdo con la vía de administración, el lugar de acción, la modalidad sensitiva y la intensidad del estímulo (Sawynok, 1987). Por ejemplo, la administración sistémica del muscimol se ha visto que produce antinocicepción (Sawynok, 1987), mientras que cuando este fármaco es administrado supraespinalmente produce un aumento de las respuestas nociceptivas (Heinricher y Kaplan, 1991).

En el campo orofacial una entidad de gran relevancia es la neuralgia trigeminal, en la cual se ha visto que tiene gran utilidad el baclofeno (Fromm *et al.*, 1984), siendo más potente el L-isómero que la forma racémica (Fromm y Terrence, 1987). Experimentalmente se ha observado que la administración sistémica de baclofeno es capaz de inhibir, casi completamente, la expresión de c-fos inducida por estimulación del ganglio de Gasser no sólo en el núcleo caudal sino también en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, concretamente en el núcleo principal, división dorsomedial del núcleo oral y división dorsomedial del núcleo interpolar (Takemura *et al.*, 2001). De particular interés es la reducción de las neuronas c-fos positivas tanto en el núcleo caudal como en la división dorsomedial del núcleo oral, los cuales están implicados en la nocicepción facial (Dallel *et al.*, 1988) e intraoral (Dallel

et al., 1990), respectivamente. Esta reducción de la inmunorreactividad de c-fos así como la aplicación clínica del baclofeno en la terapéutica de la neuralgia trigeminal ha sido asociada con el incremento de la inhibición segmentaria mediada por el GABA en el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Fromm *et al.*, 1992).

3.4.2. Técnica operatoria

Todos los procedimientos de investigación fueron efectuados mediante técnicas asépticas y bajo anestesia general, adoptándose en todo momento los cuidados postoperatorios y practicándose los procedimientos analgésicos pertinentes con el fin de reducir al mínimo el sufrimiento de los animales. Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas éticas recomendadas por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (Zimmermann, 1983).

Las ratas empleadas para establecer un estudio comparativo con la expresión de c-fos inducida en los cobayas fueron tratadas de la misma manera que estos últimos animales, por lo que todos los procedimientos que desarrollamos a continuación (apartados 3.4.2-3.4.4) son comunes a ambas especies, a pesar de que en todo momento nos referiremos a los cobayas.

El día anterior a la estimulación, los cobayas fueron rasurados en la región de las vibrisas, previa anestesia mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico o pentotal sódico (Abbott) (30-40 mg/Kg de peso). Seguidamente los animales fueron colocados en jaulas individuales hasta el momento de iniciar los procedimientos de estimulación, permitiéndoseles tener acceso a comida y agua *ad libitum*.

Entre 5 y 8 horas antes de proceder a la inyección del irritante químico nocivo, los cobayas fueron moderadamente anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (45-60 mg/Kg de peso). Durante este tiempo, los animales permanecieron en una habitación cerrada en ausencia de estímulos ambientales (p.ej. ruidos y luz) y el grado de anestesia adecuado fue mantenido con dosis suplementarias de este mismo anestésico (10-20 mg/Kg de peso). Además, la vascularización de los tejidos cutáneos fue periódicamente chequeada observando el color de las extremidades, así como su capacidad para regresar rápidamente a su estado previo tras la aplicación de presión.

Finalmente, a los cobayas les fue inyectado, mediante una microjeringa Hamilton y a temperatura ambiente, la capsaicina (M2028, Sigma), el aceite de mostaza (377430, Aldrich) o la formalina (104005, Merck). Para poder determinar la influencia del sistema GABAérgico en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza, a algunos de los animales que fueron estimulados con dicha sustancia les fue administrado sistémicamente 10 minutos antes de la aplicación de la misma, también mediante una microjeringa Hamilton y a temperatura ambiente, el agonista del receptor GABA_B baclofeno (B5399, Sigma) o el antagonista del receptor GABA_B faclofeno (P118, Sigma) (Tabla 4).

Por otra parte y con la finalidad de controlar efectos no específicos relacionados con el procedimiento de inyección, a 3 cobayas se les inyectó aceite mineral (M8410, Sigma; grupo control 1) y a otros 3 cobayas solución salina con 7,5% de DMSO (grupo control 2). Igualmente, para determinar la inmunorreactividad de c-fos de fondo y/o los efectos relacionados con la anestesia, 3 cobayas fueron anestesiados, siguiendo la pauta anteriormente descrita, sin aplicárseles ningún otro tratamiento (grupo control 3) (Tabla 4).

Los diferentes grupos de animales utilizados para estudiar la expresión c-fos fueron sacrificados a las 2 horas de la estimulación. El tiempo de supervivencia o postoperatorio utilizado, entendiéndose por éste el espacio de tiempo que media desde la aplicación del estímulo y el sacrificio del animal, fue elegido debido a que tras la aplicación de estímulos nocivos breves, la inmunorreactividad de c-fos es máxima a las 2 horas de la administración de los mismos, disminuyendo progresivamente con intervalos de tiempo mayores (Williams *et al.*, 1990; Bullitt *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1998).

3.4.3. Perfusión. Fijación. Almacenamiento y sección de los bloques de tejido nervioso

La óptima detección de la proteína c-fos además de estar influenciada por el anticuerpo primario empleado (Caston–Balderrama *et al.*, 1998) también depende del tipo de fijador utilizado (Sharp *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1992, 1993). La solución fijadora ideal debe conservar los tejidos adecuadamente para que puedan ser seccionados en el vibratomo o criostato y permitir realizar estudios tanto con

COBAYA N°	PESO	ESTIMULACIÓN	DOSIS	LUGAR DE APLICACIÓN
001	700 g	Formalina al 4% en PBS	50 µl	Vibrisas izquierda
002	700 g		75 µl	Vibrisas izquierda
003	750 g		50 µl	Vibrisas derecha
004	750 g		65 µl	Vibrisas derecha
005	700 g	Capsaicina al 0,005% en solución salina con 7,5% de DMSO	50 µl	Vibrisas derecha
006	700 g		75 µl	Vibrisas derecha
007	650 g		50 µl	Vibrisas derecha
008	800 g		75 µl	Vibrisas derecha
009	600 g	Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
010	500 g		50 µl	Vibrisas izquierda
011	800 g		50 µl	Vibrisas izquierda
012	750 g		50 µl	Vibrisas izquierda
013	650 g	Faclofeno en solución salina con 30% de metanol	2mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
014	825 g	Faclofeno en solución salina con 30% de metanol	2mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
015	700 g	Faclofeno en solución salina con 30% de metanol	2mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
016	800 g	Faclofeno en solución salina con 30% de metanol	2mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas derecha
017	650 g	Baclofeno en PBS 0,1M pH 7,4 con 40% de HCl 0,2N	20mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda

018	800 g	Baclofeno en PBS 0,1M pH 7,4 con 40% de HCl 0,2N	20mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
019	775 g	Baclofeno en PBS 0,1M pH 7,4 con 40% de HCl 0,2N	20mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas derecha
020	800 g	Baclofeno en PBS 0,1M pH 7,4 con 40% de HCl 0,2N	20mg/kg	Intraperitoneal
		Aceite de mostaza al 20% en aceite mineral	50 µl	Vibrisas derecha
021	850 g	Solución salina con 7,5% de DMSO	50 µl	Vibrisas izquierda
022	875 g		50 µl	Vibrisas izquierda
023	800 g		50 µl	Vibrisas derecha
024	725 g		50 µl	Vibrisas izquierda
025	650 g	Aceite mineral	50 µl	Vibrisas izquierda
026	750 g		50 µl	Vibrisas derecha
027	875 g		---	---
028	800 g	Control con anestesia	---	---
029	775 g		---	---

Tabla 4. Sustancias utilizadas en la estimulación, dosis administradas y lugar de aplicación de las mismas.

microscopía óptica como con microscopía electrónica de transmisión (Segade *et al.*, 1980).

El paraformaldehído al 4% tamponado, un fijador reticulante que actúa mediante la formación de puentes metileno entre los aminoácidos, ha sido ampliamente usado en investigaciones dirigidas a cuantificar la inmunoreactividad de c-fos bajo diversas condiciones de estimulación, tales como convulsiones (Morgan *et al.*, 1987), deshidratación (Sagar *et al.*, 1988), hiperosmolaridad aguda (Sharp *et al.*, 1991), estimulación eléctrica o nociva (Hunt *et al.*, 1987), lesión cerebral (Dragunow y Robertson, 1988b) y administración del factor de crecimiento nervioso (Curran y Morgan, 1985) o de hormonas (Hoffman *et al.*, 1990). En todos estos casos se ha visto

que este fijador preservaba correctamente la morfología tisular, al mismo tiempo que la unión cruzada de proteínas no impedía la penetración subsiguiente del anticuerpo.

Sin embargo, con la finalidad de mejorar la detección de la proteína c-fos la adición de acroleína a la solución fijadora ha sido empleada por diversos investigadores (Hoffman *et al.*, 1991, 1992, 1993). La acroleína, un monoaldehído altamente reactivo, penetra y estabiliza proteínas rápidamente al unirse con las terminaciones de aminoácidos libres, al mismo tiempo que cuando se emplea en concentraciones diluidas durante cortos intervalos de tiempo preserva la morfología tisular sin destruir la antigenicidad fos (King *et al.*, 1983, Caston-Balderrama *et al.*, 1998). Más específicamente, se ha visto que la fijación con acroleína al 2,5% en paraformaldehído al 4% tamponado induce un aumento global de la detección de la proteína c-fos en el tejido cerebral, siendo la tinción nuclear más inequívoca y obteniéndose una substancial reducción de la tinción de fondo en comparación a cuando como solución fijadora sólo se emplea paraformaldehído al 4% tamponado (Caston-Balderrama *et al.*, 1998).

En virtud de todas las ventajas expuestas anteriormente en relación a la adición de acroleína a la solución fijadora, en el presente trabajo se ha realizado la perfusión de los animales de experimentación destinados al estudio de la inmunorreactividad de c-fos alternando paraformaldehído al 4% tamponado con acroleína al 1,25% en paraformaldehído al 4% tamponado. La reducción en la concentración de acroleína empleada con respecto a otras investigaciones previas (Hoffman *et al.*, 1991; Caston-Balderrama *et al.*, 1998) se ha hecho para minimizar la exposición potencialmente dañina de los investigadores a este fijador tóxico y para evitar la aparición de falsos positivos observada en nuestro laboratorio (datos sin publicar) cuando se empleaban concentraciones superiores al 1,25%.

a) Soluciones empleadas en la perfusión

La perfusión de los animales de experimentación se llevó a cabo mediante el empleo de una solución salina fisiológica y dos tipos de soluciones fijadoras.

- Solución salina fisiológica:
 - Cloruro sódico (106404, Merck): 0,9 g
 - Nitrito sódico (822285, Merck): 0,1 g
 - Heparina (Rovi): 10.000-20.000 U.I.

- Agua destilada: 100 ml
- Solución fijadora C:
Paraformaldehído al 4% y acroleína (01680, Fluka) al 1,25% en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4.
- Solución fijadora D:
Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4.

b) Técnica de perfusión

Los cobayas fueron reanestesiados profundamente mediante inyecciones intraperitoneales de uno de los dos anestésicos anteriormente citados (50-70 mg/Kg de peso) e inmovilizados sobre la mesa de operaciones en posición decúbito supino. Durante el procedimiento quirúrgico, y cuando fue necesario, el grado de anestesia óptimo fue mantenido con dosis suplementarias de éter dietílico (192770, Panreac), aplicado periódicamente cerca de las narinas mediante algodones humedecidos en esta sustancia.

Previo rasuramiento de los cobayas a nivel torácico y abdominal, se realizó una incisión longitudinal y medial, con la ayuda de un bisturí, desde la escotadura yugular del esternón hasta la parte caudal del abdomen, separándose a continuación el tegumento a ambos lados mediante mosquitos y separadores. Seguidamente, con unas tijeras finas se procedió a hacer una incisión longitudinal y media en la pared abdominal, separándose las vísceras con el fin de poder visualizar el diafragma para su posterior seccionamiento. A continuación, con unas tijeras gruesas se abrió la cavidad torácica, realizándose maniobras de hemostasia en la parrilla costal mediante un mosquito. Una vez que el corazón fue totalmente visible, se clampó la aorta torácica y se aisló la aorta ascendente con unas pinzas pequeñas y curvas; inmediatamente se hizo una incisión a nivel del ápex del corazón, a través del cual se introdujo una cánula, que estaba conectada con un catéter, hasta el cayado de la aorta fijándose a esta altura con un mosquito.

Acto seguido y después de realizar un corte a nivel de la aurícula derecha, los animales fueron perfundidos a través de la aorta ascendente. En primer lugar, fueron inyectados rápidamente (20-40 segundos) a 35°C 120 ml de la solución salina fisiológica con el fin de evitar el colapso de los vasos y prevenir la formación de

coágulos sanguíneos, facilitando de esta forma el posterior paso del fijador. Una vez eliminada la sangre del árbol vascular, los cobayas fueron perfundidos durante 5-10 minutos con 300 ml de la solución fijadora C a una temperatura de unos 4°C, completándose finalmente la perfusión con 1,2 litros de la solución fijadora D, también a 4°C, aplicada durante 35-40 minutos.

Esta misma pauta de perfusión fue utilizada en los cobayas reservados para el análisis topográfico de la organización nuclear del tronco encefálico y médula espinal cervical superior.

c) Extracción del encéfalo y médula espinal: postfijación

Tras la perfusión, se procedió a la extracción del encéfalo de la bóveda craneal y de la médula cervical del conducto vertebral, realizándose la disección del tronco encefálico y de la médula espinal en un solo bloque. Para mejor visibilidad, todos los procedimientos de extracción fueron efectuados mediante el empleo de una lupa y aporte adicional de luz fría.

Primeramente fue aislada la cabeza y el cuello del resto del cuerpo, para facilitar las posteriores maniobras de extracción, retirándose seguidamente con un cincel los tejidos blandos (piel, músculos, tejido adiposo) hasta lograr tener acceso directo a la estructura ósea. A continuación, ayudándose alternativamente de tijeras y gubias de distintos tamaños, se realizó una ostectomía de los huesos craneales discurriendo en sentido fronto-occipital y se eliminaron los arcos vertebrales cervicales teniendo sumo cuidado de no dañar la región dorsal de la médula espinal. Con la finalidad de extraer el tronco encefálico y la médula cervical, se extirpó el cerebelo tras seccionar los tres pares de pedúnculos cerebelosos, se extrajo el cerebro, para lo cual se efectuó una incisión inmediatamente rostral a los colículos superiores, y se cortaron los nervios craneales y las raíces anteriores y posteriores de los nervios espinales.

Una vez concluidas las maniobras de extracción, el tejido nervioso constituido por el tronco encefálico y la médula espinal fue seccionado transversalmente en 4 bloques: mesencéfalo, mitad rostral del bulbo raquídeo (desde la formación reticular pontina hasta el núcleo motor del facial), mitad caudal del bulbo raquídeo (desde el núcleo motor del facial hasta el óbex) y médula cervical, dentro de la cual se incluía la región del bulbo situada caudalmente al óbex. Finalmente, los distintos bloques de tejido nervioso destinados al estudio de la inmunorreactividad de c-fos así como al

análisis topográfico de la organización nuclear del sistema nervioso central, fueron postfijados mediante inmersión en la solución fijadora D durante 31-38 horas a 4°C y posteriormente almacenados en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4 (PBS) a la misma temperatura. La postfijación es un paso de suma importancia, principalmente cuando quedan zonas de tejido pobremente perfundidas, ya que permite obtener una consistencia adecuada para poder efectuar con éxito su posterior seccionamiento en el vibratomo.

d) Sección de los bloques de tejido nervioso

En el presente trabajo, así como en otras investigaciones en las que se ha estudiado la inmunorreactividad de c-fos (p.ej. Sharp *et al.*, 1989c), la expresión de neuropéptidos implicados en la transmisión de información nociceptiva tales como el CGRP (p.ej. Bennett-Clarke y Chiaia, 1992) o las proyecciones trigeminales (p.ej. Segade *et al.*, 1990), los cortes de tejido nervioso fueron obtenidos mediante un vibratomo, debido a que éste permite realizar secciones con una morfología excelente, a diferencia de los cortes obtenidos por congelación, donde la formación de microcristales de agua conllevan una alteración de la estructura del tejido, el cual se caracteriza por presentar un aspecto vacuolizado (LaVail, 1978).

Los bloques de tejido nervioso destinados al estudio de la expresión c-fos así como los empleados para el análisis de la organización nuclear del sistema nervioso central inmediatamente tras ser extraídos del PBS y ser ligeramente secados, fueron fijados por su zona más caudal mediante cianocrilato (Loctite Super Glue3, Henkel Iberica) a los portabloques de un vibratomo Lancer para su posterior seccionamiento. Previa comprobación del ángulo de corte y llenado del baño del vibratomo con PBS, se ajustaron los parámetros de vibración, velocidad y temperatura del baño y se situó el portabloques en la parte correspondiente del vibratomo, obteniéndose secciones transversales seriadas de 75 µm de espesor. Cada uno de los cortes fueron recogidos con un pincel fino y depositados en cubetas conteniendo PBS a 4°C hasta su posterior procesamiento. Se ha empleado PBS y no agua destilada para realizar el almacenamiento de las secciones, debido a que el primero evita alteraciones en la morfología asociadas a cambios osmóticos.

3.4.4. Demostración inmunohistoquímica de la proteína c-fos

Antes de proceder al estudio inmunohistoquímico, las secciones fueron tratadas primeramente durante 20 minutos a temperatura ambiente con borohidruro de sodio al 1% en PBS para reducir grupos aldehídos residuales de la fijación y disminuir la inmunorreactividad de c-fos de fondo y, a continuación durante 30 minutos, también a temperatura ambiente, con peróxido de hidrógeno al 5% con la finalidad de bloquear la actividad peroxidásica endógena. Tras la aplicación de ambas sustancias se realizaron múltiples lavados con PBS.

Seguidamente, el tejido fue incubado durante 60-65 horas a 4°C en un anticuerpo primario policlonal elaborado en oveja (OA-11-824, Cambridge Research Biochemicals, dilución 1:4000), reaccionando posteriormente el producto de reacción con un anticuerpo secundario conjugado con biotina elaborado en conejo (BA6000, Vector Laboratories, dilución 1:720) o en burro (713-065-147, Jackson Immunoresearch, dilución 1:500) durante 75-90 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, y realizándose 3 lavados con PBS de 15 minutos cada uno tras la aplicación de todos los anticuerpos. Tanto el anticuerpo primario como los dos secundarios fueron diluidos en tampón fosfato salino 0,05M pH 7,4 con 0,4% de tritón X-100. Finalmente, las secciones fueron tratadas durante 60-90 minutos a temperatura ambiente y agitación suave en una solución del complejo avidina-biotina-peroxidasa recién preparada; empleándose 1 gota del bote A (avidina DH) y otra del bote B (peroxidasa biotinada) por cada 5 ml de PBS con tritón X-100 al 0,4%. Después de tres lavados con PBS de 15 minutos cada uno, las secciones fueron reveladas empleando el cromógeno DAB; inicialmente el tejido fue incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía DAB al 0,05% en PBS, seguido por un tiempo adicional de 20 minutos en esta misma solución, pero a la que a mayores se le añadió el sustrato peróxido de hidrógeno al 0,01%. La oxidación del DAB, da lugar a un producto de color marrón oscuro que es insoluble en agua y disolventes orgánicos.

Las secciones fueron posteriormente aclaradas en PBS, montadas en portaobjetos SuperFrost® Plus, secadas al aire, deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, comenzando en alcohol de 70° hasta alcohol absoluto, y aclaradas con xileno. Finalmente fueron puestos los cubreobjetos, empleando como resina de montaje Entellan.

3.5. Tinciones histológicas complementarias

Las secciones de los cobayas reservadas para el estudio morfológico del sistema nervioso central (Tabla 1), una vez fueron montadas en portaobjetos y secadas al aire, fueron sumergidas durante 5-10 minutos en una solución tampón con tionina (Merck) al 0,1% pH 4. Seguidamente, los cortes fueron deshidratados en alcohol de 96° y alcohol absoluto, aclarados con xileno, y montados utilizando como resina el Entellan.

3.6. Observación del material

Una vez concluidas las fases experimental y de laboratorio, se procedió al estudio mediante microscopía óptica (Microphot-FX de Nikon), de todas las secciones del tronco encefálico y primer segmento cervical.

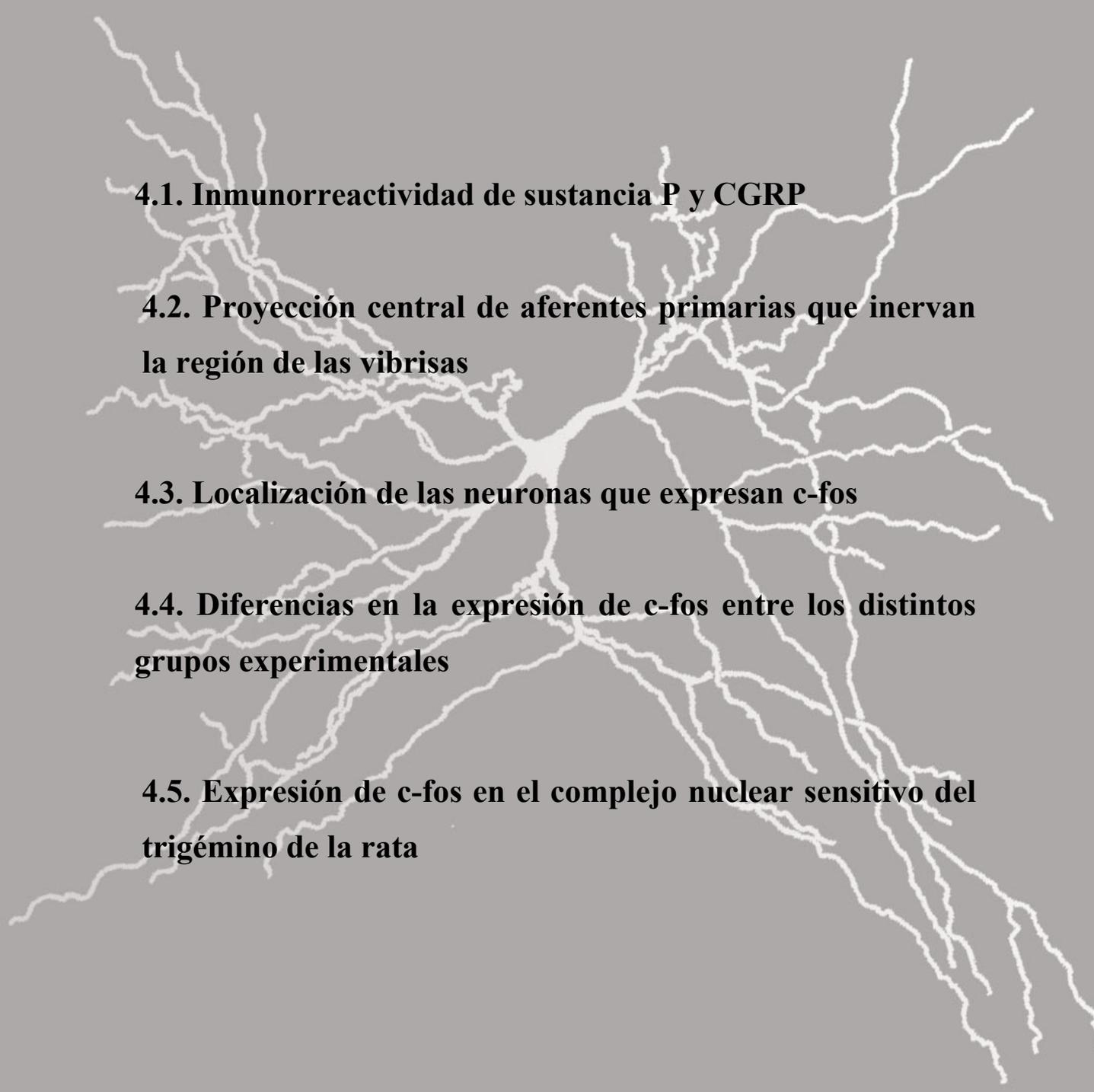
En cada animal, el conteo de los núcleos c-fos positivos que fueron densamente teñidos con el producto de reacción de DAB, fue efectuado en todas las secciones correspondientes a los núcleos parabraquial medial y lateral, núcleo de Kölliker-Fuse, núcleos paratrigeminales rostral, dorsal y ventral, complejo nuclear sensitivo del trigémino, formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino y tercio rostral del primer segmento cervical, tanto a nivel ipsilateral como contralateral. El conteo fue realizado manualmente, por duplicado, en distintos días y por dos observadores diferentes desconocedores del tratamiento experimental efectuado, anotándose los valores obtenidos de cada vez en hojas nuevas. La razón por la cual el conteo fue evaluado en repetidas ocasiones y en diferentes días fue para garantizar que se tuviera un buen indicador del número de neuronas c-fos inmunorreactivas en las áreas evaluadas y para minimizar la posibilidad de que los examinadores recordaran los valores previos. Posteriormente fue hallada la media de los dos valores obtenidos en cada sección por cada uno de los observadores, realizándose un análisis estadístico de los mismos (test t-Student; nivel de significación $p < 0,05$) con el fin de verificar que no se habían cometido errores en la cuantificación así como en la localización nuclear de las neuronas. Una vez corroborada esta premisa, la media de los cuatro valores por sección fue empleada para los subsiguientes estudios.

La inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial (núcleo de Kölliker-Fuse y núcleos parabraquiales medial y lateral) y en el núcleo caudal y primer segmento cervical fue analizada en conjunto, sin considerar su localización rostrocaudal; mientras que en el resto de los núcleos, la expresión de c-fos fue estudiada por niveles (6 u 8 niveles) para determinar su distribución rostrocaudal. El test ANOVA fue utilizado para determinar diferencias en la inmunorreactividad de c-fos entre los distintos grupos experimentales (nivel de significación $p < 0,05$), para lo cual fue necesario calcular la media a través de los distintos animales que habían recibido el mismo tratamiento experimental. Por otra parte, las diferencias en la expresión de c-fos entre el lado ipsilateral y el contralateral fueron estudiadas mediante el test t Student (nivel de

significación $p < 0,05$). Además del análisis estadístico, las neuronas c-fos positivas han sido representadas gráficamente por niveles tanto en histogramas como en dibujos de cámara clara obtenidos mediante un microscopio Optiphot-2 de Nikon, indicando la contribución ipsilateral y contralateral.

El estudio de la inmunorreactividad de c-fos, CGRP y sustancia P y el análisis de las proyecciones centrales de las aferentes de la región de las vibrisas fue complementado mediante microfotografías realizadas con un fotomicroscopio Microphot-FX-35DX de la casa Nikon.

4. Resultados



4.1. Inmunorreactividad de sustancia P y CGRP

4.2. Proyección central de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas

4.3. Localización de las neuronas que expresan c-fos

4.4. Diferencias en la expresión de c-fos entre los distintos grupos experimentales

4.5. Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino de la rata

4.1. Inmunorreactividad de sustancia P y CGRP

4.1.1. CGRP

Las secciones de tejido nervioso correspondientes al tallo cerebral y a la médula espinal cervical presentaron un marcaje excelente de fibras CGRP positivas. Por el contrario, no se observó ningún tipo de inmunorreactividad de CGRP más allá de unas 300-400 μm cranealmente al polo rostral del núcleo motor del trigémino. A la altura del tallo nervioso, las fibras con inmunorreactividad de CGRP fueron registradas en las raíces sensitivas del trigémino.

Rostralmente, las fibras CGRP positivas procedentes del nervio trigémino alcanzaron la región caudal del *complejo parabraquial*. Dentro del complejo parabraquial, las fibras CGRP inmunorreactivas se observaron preferentemente en la región parabraquial medial, y más concretamente en la región denominada como núcleo parabraquial medial externo (Figs. 1A-B). Igualmente, también se registraron algunas fibras dispersas en la región caudal del núcleo parabraquial lateral externo y del núcleo de Kölliker-Fuse.

A la altura del *núcleo principal del trigémino*, se observaron fibras CGRP positivas tanto en la región dorsal como en la región ventral de dicho núcleo. En el tercio anterior del núcleo principal del trigémino, se identificó una zona de densa proyección de fibras CGRP positivas en la región lateral del subnúcleo principal dorsal (Figs. 1D-E), y en menor medida, una proyección de fibras no tan densa en la región medial del subnúcleo principal ventral. Más caudalmente, las fibras CGRP positivas fueron muy escasas en el núcleo principal del trigémino, concentrándose la mayoría de éstas en el subnúcleo dorsal, aunque algunas fibras muy aisladas también fueron halladas en el subnúcleo ventral. Al margen de las fibras CGRP inmunorreactivas registradas dentro del núcleo principal del trigémino, se observó una positividad moderada en las neuronas del núcleo motor del trigémino (Figs. 1A-D).

Las fibras CGRP positivas se observaron a todo lo largo del *núcleo oral del trigémino*, pero con una distribución irregular en sentido rostrocaudal y dorsoventral. En las regiones más rostrales del núcleo oral, a la altura de la oliva superior, las fibras CGRP positivas se hallaron principalmente en el núcleo oral dorsal, donde adoptaron una disposición bastante laxa, arborizándose preferentemente en el área lateral de dicha

región dorsal. Por el contrario, en el núcleo oral ventral únicamente fueron observados algunos bulbos terminales. A la altura del polo rostral del núcleo motor del trigémino, la proyección en el área dorsal oral se hizo más densa, a pesar de que el territorio que ocupaban dichas fibras de proyección era muy inferior al observado en la rata. Igualmente, a este nivel, algunas fibras parecían terminar en pequeñas islas dentro de la región dorsal del tracto sensitivo del trigémino. Caudalmente, a partir del tercio medio del núcleo oral, las fibras CGRP positivas se observaron tanto en la región dorsal como en la región ventral del núcleo oral del trigémino (Figs. 2C-D), registrándose siempre una mayor proyección de fibras en la primera que en la segunda. Preferentemente, las fibras con inmunorreactividad de CGRP terminaron en el área del núcleo sensitivo que colinda con el tracto espinal del trigémino, aunque algunas de estas fibras, como se puede ver en las figuras, terminaron en pequeñas islas localizadas dentro de dicho tracto. Ya hacia la parte final del núcleo oral del trigémino, se observaron fibras CGRP positivas entrando en el núcleo del fascículo solitario. De un modo similar al núcleo motor del trigémino, también se observaron neuronas moderadamente CGRP positivas en el núcleo motor del facial (Fig. 2C) y en el núcleo abducens.

A todo a lo largo del *núcleo interpolar del trigémino*, se observaron fibras CGRP positivas en las regiones dorsal y ventral (Figs. 3A-C) de dicho núcleo, en los núcleos paratrigeminales dorsal (Figs. 3A-B) y ventral, en el núcleo del fascículo solitario (Figs. 3A-D) y en la formación reticular colindante con el núcleo interpolar (formación reticular parvocelular), tanto a nivel dorsal como a nivel ventral. Las fibras CGRP positivas fueron muy escasas en la parte rostral del núcleo interpolar, sin embargo, al dirigirnos caudalmente, las fibras comenzaron a hacerse más manifiestas en las regiones ventral y dorsal de dicho núcleo. Las fibras identificadas dentro del territorio del núcleo interpolar ventral se localizaron preferentemente dentro de la región ventromedial del mismo (Figs. 3A y C), mientras que las fibras halladas dentro del núcleo interpolar dorsal siempre se situaron en la zona limítrofe del núcleo interpolar con el tracto espinal del trigémino. Por el contrario, se observó una importante densidad de fibras CGRP positivas tanto en el núcleo paratrigeminal dorsal (Figs. 3A y B) como en el ventral (Fig. 4D). Asimismo, ya en el tercio caudal del núcleo interpolar empezaron a observarse numerosas fibras en la región marginal entre el núcleo interpolar y el tracto espinal trigeminal, lo que se correspondería con una prolongación rostral de las láminas I y II del núcleo caudal del trigémino (Fig. 4C). A lo largo del núcleo interpolar, se observaron fibras aisladas distribuidas laxamente en la formación

reticular parvocelular, que limita medialmente el núcleo interpolar. Muchas de estas fibras, de un modo más o menos constante, se localizaron en el borde dorsomedial del núcleo interpolar así como en su borde ventromedial, a pesar de que otras fibras discurrían hacia la formación reticular lateral ventral (Figs. 4A y B).

A lo largo de todo el *núcleo caudal del trigémino*, se registró una muy densa proyección de fibras CGRP positivas localizada fundamentalmente en las láminas I-IIo (Figs. 4D y E), con algunos acúmulos aislados en el límite entre las láminas IV y V (Fig. 4E). En la médula espinal cervical, igualmente se registró una muy densa proyección de fibras con inmunorreactividad de CGRP en las láminas I y IIo, así como islas intersticiales en el tracto de Lissauer. Además, se hallaron proyecciones aisladas en la lámina III (también se observan en el tercio caudal del núcleo caudal del trigémino) y en el límite entre las láminas IV y V (Figs. 5C y D). Por otro lado, también se registró una reacción moderadamente positiva en algunas de las partes del núcleo ambiguo y en las células del núcleo motor del hipogloso.

4.1.2. Sustancia P

En nuestro laboratorio, previamente al empleo del anticuerpo de abcam número ab14184, se realizaron estudios encaminados a determinar la expresión de la sustancia P en el sistema nervioso central empleando otros anticuerpos policlonales. Algunos de estos anticuerpos, como el comercializado hace años por Amersham, pese a ofrecer buenos resultados en la rata, comprobamos que no eran válidos para una detección específica de la sustancia P en el sistema nervioso central del cobaya. El anticuerpo ab14184 es un anticuerpo monoclonal producido a partir de un péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1-11 de la sustancia P humana. Según la ficha comercial, dicho anticuerpo reacciona específicamente con la sustancia P de humanos, de rata y de cobaya y no presenta reactividad cruzada con otras taquicinas, tales como la neuroquinina A, neuroquinina B y la casinina.

El estudio de la inmunorreactividad de sustancia P se llevó a cabo con la finalidad de establecer una comparación con la distribución de CGRP en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y en la médula espinal cervical.

En el *núcleo principal del trigémino*, se observó una densa proyección de fibras sustancia P positivas en la región dorsolateral del subnúcleo principal dorsal (Fig. 1C).

Esta zona con inmunorreactividad de sustancia P se solapaba con el territorio en el cual se vio proyección de fibras CGRP positivas (Fig. 1D).

En el **núcleo oral del trigémino**, la sustancia P se localizó de manera discontinua en las zonas marginales del núcleo oral tanto a nivel dorsal como ventral (Figs. 2A-B), de manera similar a lo observado en relación al CGRP (Figs. 2C-D). Sin embargo, en comparación con este último, se registró una proyección más densa de fibras reactivas para sustancia P en el núcleo del fascículo solitario y en la formación reticular que bordea medialmente el núcleo oral del trigémino (Fig. 2A). Incluso, algunas de estas fibras alcanzaron la región medial de los núcleos oral ventral y dorsal.

A la altura del **núcleo interpolar del trigémino**, se observaron importantes acúmulos de sustancia P en los núcleos paratrigeminales y en la región marginal del núcleo interpolar, de manera similar a lo descrito en relación con el CGRP.

En el **núcleo caudal del trigémino** y en la **médula espinal cervical**, se registraron acúmulos muy densos de sustancia P en las láminas I-IIo (Figs. 5A-B). Además, también se observaron muchas fibras sustancia P positivas en el núcleo espinal lateral (Fig. 5A), las cuales no contienen CGRP. En las láminas III y IV prácticamente no se observó inmunorreactividad para sustancia P, a excepción de una pequeña zona con fibras sustancia P positivas presente en la lámina III (Fig. 5A). Finalmente, cabe destacar las fibras más o menos numerosas observadas en la lámina V e incluso en láminas más profundas del asta ventral.

4.2. Proyección central de aferentes primarias que inervan la región de las vibrisas

4.2.1. CTb-HRP

El transporte transganglionar de la CTb-HRP ha dado como resultado un precipitado positivo a lo largo de toda la extensión rostrocaudal del complejo nuclear sensitivo del trigémino y del asta dorsal del primer segmento de la médula cervical. La región donde se ha observado el precipitado coincide con el territorio presuntivo de la rama infraorbitaria de la segunda división del nervio trigémino, es decir, la rama maxilar.

En el *núcleo principal del trigémino*, el producto de reacción está situado en la parte ventral y lateral, aunque también se han identificado algunas fibras que alcanzan la zona medial (Fig. 6A). A la altura de dicho núcleo igualmente se observan fibras nerviosas marcadas que discurren en el tracto sensitivo del trigémino, concretamente en la zona media y ventral del mismo.

En el *núcleo oral del trigémino*, el precipitado se observa en toda su extensión sin presentar ninguna preponderancia rostrocaudal, localizándose principalmente en la región lateral del núcleo oral ventral (Figs. 6B-C). Sin embargo, en la zona caudal del núcleo oral, pese a que el precipitado es más manifiesto en la zona lateral y ventral, siendo muy escaso o nulo en la zona más ventral del núcleo, también existen algunas terminaciones hacia la zona medial de la región ventral del núcleo sensitivo. A diferencia de lo observado con CGRP, no se observa ningún precipitado dentro del tracto sensitivo trigeminal a la altura del núcleo oral.

En el *núcleo interpolar del trigémino*, el producto de reacción se concentra preferentemente en la región media, ocupando el territorio descrito somatotópicamente como área de recepción de las vibrisas (Fig. 6D). A partir de la mitad caudal del núcleo interpolar también se aprecia algún precipitado, aunque no muy intenso en la región más ventral del núcleo interpolar, observándose producto de reacción dentro del tracto sensitivo del trigémino en el territorio descrito como núcleo paratrigeminal, tanto a nivel dorsal como ventral (Fig. 7A).

En el comienzo del *núcleo caudal del trigémino* el precipitado es más manifiesto que en el núcleo precedente, localizándose en toda la extensión de la lámina

I y algo de la lámina IIo así como en las láminas III-V, pero en este caso confinado en la zona media (Fig. 7B). A este nivel, así como en toda la extensión del núcleo el producto de reacción es muy numeroso y más intenso en estas láminas, disminuyendo hacia el tercio caudal del mismo. Sin embargo, en el tercio final del núcleo caudal, el precipitado también se observa en la lámina III, desapareciendo de la lámina IIo (Fig. 7C).

En el comienzo del *primer segmento cervical*, el precipitado se restringe a la lámina I, quedando algún precipitado disperso en las láminas III-IV, siempre a nivel de la zona media.

4.2.2. IB4-HRP

La inyección de IB4-HRP en la región de las vibrisas marcó fibras en el tracto espinal trigeminal localizadas en el territorio propio de la segunda división del nervio trigémino, es decir, en la región media del tracto, aunque ocasionalmente también se vio alguna fibra en el tercio ventral del mismo.

Por otra parte, no hemos visto terminaciones consistentes de aferentes primarias marcadas con este trazador en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino ni tampoco en los núcleos paratrigeminales. La única proyección intensa y reproducible de fibras IB4-HRP positivas se situó en el tercio final del núcleo caudal del trigémino, concretamente en la zona media de las láminas I y II, pudiendo identificarse también algunas fibras más laxas en la lámina III de Rexed (Fig. 7D-E).

4.2.3. WGA-HRP

Fibras positivas se hallaron a lo largo del tracto espinal del trigémino y del tracto de Lissauer en el primer segmento de la médula cervical espinal. Estas fibras discurrieron preferentemente en la región media del tracto espinal del trigémino. La distribución de las terminaciones centrales de las aferentes primarias procedentes de la región facial de las vibrisas visualizadas con WGA-HRP es muy similar a la obtenida con el conjugado IB4-HRP. En los núcleos paratrigeminales así como en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino no se observó ningún producto de reacción, salvo algunas fibras tenuemente marcadas presentes en los núcleos rostrales trigeminales. El transporte transganglionar del conjugado WGA-HRP únicamente dio

como resultado un precipitado positivo intenso en las láminas I y II del núcleo caudal del trigémino, en la misma localización que el conjugado IB4-HRP, observándose también escaso marcaje hacia las láminas III y IV de Rexed.

4.3. Localización de las neuronas que expresan c-fos

El número y el porcentaje de neuronas activadas en cada uno de los núcleos en los que se ha realizado un estudio cuantitativo tras la estimulación de la región de las vibrisas, han sido representados en las Tablas 5-82. Además, en los núcleos oral e interpolar del trigémino, en la formación reticular ventral colindante con los núcleos oral e interpolar del trigémino y en los núcleos paratrigeminales, se ha especificado la localización rostrocaudal de la inmunorreactividad de c-fos.

4.3.1. Controles

Los animales estimulados con solución salina o aceite mineral no presentaron ningún signo de inflamación en la región de las vibrisas tras su inyección. Igualmente, los cobayas tampoco respondieron mediante reacciones reflejas nociceptivas inmediatamente después de la administración de dichas sustancias químicas.

a) Solución salina

La inyección de solución salina en la región de las vibrisas indujo inmunorreactividad de c-fos en los núcleos oral, interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial. La expresión de c-fos en los núcleos interpolar dorsal y paratrigeminal ventral no presentó diferencias significativas entre ambos lados. Por el contrario, la inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral ventral y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar fue estadísticamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral, observándose el efecto contrario en el resto de las estructuras donde hallamos neuronas c-fos positivas.

Núcleo principal del trigémino

La inyección de solución salina en la región de las vibrisas no indujo ninguna expresión de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

La solución salina indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral, a excepción del nivel más rostral del núcleo oral contralateral. Mientras que en el lado ipsilateral, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo oral (50,9% de las neuronas), en el lado contralateral, las neuronas se distribuyeron de manera uniforme en sentido rostrocaudal (Tabla 5). Al analizar la distribución dorsoventral de la inmunorreactividad de c-fos se constató que ésta era mayor en la división dorsal que en la división ventral del núcleo oral ipsilateral, observándose lo contrario en el lado contralateral. En el núcleo oral dorsal, el número de neuronas c-fos positivas fue significativamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral en todos los niveles; mientras que en el núcleo oral ventral, el número de neuronas con expresión de c-fos fue estadísticamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral en el segundo, tercero, cuarto y séptimo nivel (Tabla 6). La inmunorreactividad de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en las dos divisiones del núcleo oral.

NÚCLEO ORAL				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	2	1,5	0	0
Segundo	18	13,8	6	13,6
Tercero	18	13,8	10	22,7
Cuarto	14	10,8	6	13,6
Quinto	12	9,2	2	4,5
Sexto	32	24,7	4	9,1
Séptimo	26	20	12	27,4
Octavo	8	6,2	4	9,1
TOTAL	130±31,2	100	44±11,3	100

Tabla 5. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo interpolar del trigémino

La solución salina indujo expresión de c-fos bilateral prácticamente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en la mitad caudal del núcleo (87,9% a nivel ipsilateral; 82,9% a nivel contralateral) (Tabla 7). Al analizar la distribución dorsoventral de la inmunorreactividad de c-fos, se observó que ésta era más manifiesta

en la división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolar. Mientras que en el núcleo interpolar ventral, el número de neuronas c-fos positivas fue significativamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral en los dos tercios caudales del núcleo; en el núcleo interpolar dorsal, las diferencias entre ambos lados fueron estadísticas en el primer, tercer y sexto nivel (Tabla 8). La expresión de c-fos se localizó principalmente en la región ventromedial y ventrolateral del núcleo interpolar ventral.

Nivel	NÚCLEO ORAL DORSAL					NÚCLEO ORAL VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	2	100	0	0	0,02	0	0	0	0	ND
Segundo	18	100	0	0	<0,001	0	0	6	100	0,003
Tercero	18	100	0	0	<0,001	0	0	10	100	0,001
Cuarto	10	100	0	0	0,001	4	40	6	60	0,038
Quinto	12	85,7	2	14,3	0,001	0	0	0	0	ND
Sexto	30	88,2	4	11,8	<0,001	2	100	0	0	0,02
Séptimo	22	78,6	6	21,4	<0,001	4	40	6	60	0,038
Octavo	8	66,7	4	33,3	0,008	0	0	0	0	ND
TOTAL	120±28,7	88,2	16±2,3	11,8	0,002	10±0,4	26,3	28±4,7	73,7	0,02

Tabla 6. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR			
	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0	2	2,6
Segundo	1	0,7	0	0
Tercero	16	11,4	11	14,5
Cuarto	43	30,7	21	27,6
Quinto	31	22,2	14	18,5
Sexto	49	35	28	36,8
TOTAL	140±31,9	100	76±11,1	100

Tabla 7. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

La solución salina indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1). A excepción de la lámina V, en las restantes láminas se hallaron diferencias significativas entre el lado ipsilateral y el contralateral en relación con el número de neuronas c-fos positivas (Tabla 9). Al analizar la

distribución dorsoventral de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 68,3% de las neuronas ipsilaterales y el 51% de las neuronas contralaterales (Tabla 9). Las neuronas activadas por la solución salina se localizaron fundamentalmente en la región ventral de las láminas I y II en los dos tercios rostrales del núcleo caudal; y en la región ventral únicamente de la lámina I en el tercio caudal del núcleo caudal y en C1.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	0	0	2	100	0,038	0	0	0	0	ND
Segundo	0	0	0	0	ND	1	100	0	0	0,057
Tercero	0	0	6	100	0,003	16	76,2	5	23,8	0,001
Cuarto	2	50	2	50	ND	41	68,3	19	31,7	<0,001
Quinto	2	50	2	50	ND	29	70,7	12	29,3	<0,001
Sexto	4	100	0	0	0,006	45	61,6	28	38,4	<0,001
TOTAL	8±0,4	40	12±0,3	60	0,053	132±32,2	67,3	64±8,7	32,7	<0,001

Tabla 8. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Láminas	NÚCLEO CAUDAL Y C1						
	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	p
I y II	496	68,3	70,9	204	51	29,1	<0,001
III	86	11,8	64,2	48	12	35,8	<0,001
IV	26	3,6	46,4	30	7,5	53,6	0,008
V	118	16,3	50	118	29,5	50	ND
TOTAL	726±199,2	100	64,5	400±126,3	100	35,5	<0,001

Tabla 9. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

A la altura del núcleo oral, la solución salina indujo inmunorreactividad de c-fos ipsilateralmente en casi toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral y contralateralmente en los tercios rostral y caudal de la formación reticular ventral. En el lado ipsilateral las neuronas c-fos positivas se distribuyeron de manera uniforme en sentido rostrocaudal por toda la formación reticular ventral (Tabla 10). La expresión de c-fos fue mayor en la formación reticular ventral ipsilateral que en la contralateral, hallándose diferencias significativas entre ambos lados en todos los niveles a excepción

del primer y octavo nivel (Tabla 10). La inmunorreactividad de c-fos se localizó, casi de manera exclusiva, medialmente a la región más ventral del núcleo oral y del tracto trigeminal espinal.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	10	10,9	83,3	2	9,1	16,7	0,002
Tercero	16	17,4	61,5	10	45,4	38,5	0,003
Cuarto	24	26,1	100	0	0	0	<0,001
Quinto	8	8,7	100	0	0	0	0,002
Sexto	6	6,5	100	0	0	0	0,003
Séptimo	20	21,7	90,9	2	9,1	9,1	<0,001
Octavo	8	8,7	50	8	36,4	50	ND
TOTAL	92±16,5	100	80,7	22±4,8	100	19,3	<0,001

Tabla 10. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

A la altura del núcleo interpolar, la solución salina indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral. Sin embargo, la mayor parte de la inmunorreactividad de c-fos se observó en el tercio caudal de la formación reticular ventral (42,6% en el lado ipsilateral; 43,5% en el lado contralateral) (Tabla 11). El número de neuronas c-fos positivas fue mayor en la

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	18	26,5	52,9	16	17,4	47,1	0,02
Segundo	4	5,9	22,2	14	15,2	77,8	0,001
Tercero	7	10,3	46,7	8	8,7	53,3	0,183
Cuarto	10	14,7	41,7	14	15,2	58,3	0,008
Quinto	9	13,2	33,3	18	19,6	66,7	0,001
Sexto	20	29,4	47,6	22	23,9	52,4	0,038
TOTAL	68±12,2	100	42,5	92±14	100	57,5	<0,001

Tabla 11. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

formación reticular ventral contralateral que en la ipsilateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados en todos los niveles a excepción del tercer nivel (Tabla

11). Las neuronas activadas por la solución salina se localizaron medialmente al núcleo interpolar ventral, no existiendo prácticamente expresión de c-fos medialmente a la región más ventral del núcleo paratrigeminal ventral.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

La solución salina indujo escasa inmunorreactividad de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral, la cual se localizó en los tercios rostral y caudal del mismo (Tabla 12). El número de neuronas c-fos positivas fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias significativas entre ambos lados en todos los niveles a excepción del cuarto, quinto y octavo nivel (Tabla 12). La expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral adoptó una distribución anárquica en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	2	16,7	100	0	0	0	0,02
Segundo	2	16,7	100	0	0	0	0,02
Tercero	0	0	0	4	100	100	0,008
Cuarto	0	0	0	0	0	0	ND
Quinto	0	0	0	0	0	0	ND
Sexto	4	33,3	100	0	0	0	0,006
Séptimo	4	33,3	100	0	0	0	0,006
Octavo	0	0	0	0	0	0	ND
TOTAL	12±1,5	100	75	4±0,5	100	25	0,009

Tabla 12. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

La solución salina indujo inmunorreactividad de c-fos bilateralmente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral, a excepción del tercio rostral del núcleo contralateral. Sin embargo, la mayor parte de la expresión de c-fos se situó en la mitad caudal del núcleo (75% a nivel ipsilateral; 92,9% a nivel contralateral) (Tabla 13). La solución salina activó un mayor número de neuronas en el lado ipsilateral que en el contralateral, siendo las diferencias estadísticas entre ambos lados en todos los niveles a excepción del tercer nivel (Tabla 13). Las neuronas c-fos positivas se localizaron principalmente en el tercio ventral del núcleo paratrigeminal ventral.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	4	10	100	0	0	0	0,006
Segundo	3	7,5	100	0	0	0	0,01
Tercero	3	7,5	60	2	7,1	40	0,057
Cuarto	5	12,5	38,5	8	28,6	61,5	0,015
Quinto	11	27,5	61,1	7	25	38,9	0,006
Sexto	14	35	56	11	39,3	44	0,01
TOTAL	40±9,8	100	58,8	28±6,5	100	41,2	0,053

Tabla 13. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo paratrigeminal dorsal

La solución salina indujo una mínima expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal dorsal, la cual se registró en el tercio caudal del núcleo, tanto a nivel ipsilateral como contralateral (Tabla 14). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias significativas entre ambos lados únicamente en el sexto nivel (Tabla 14). Las neuronas c-fos positivas se distribuyeron anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal dorsal.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	0	0	0	0	0	0	ND
Cuarto	0	0	0	0	0	0	ND
Quinto	3	37,5	42,9	4	100	57,1	0,183
Sexto	5	62,5	100	0	0	0	0,005
TOTAL	8±0,8	100	66,7	4±0,3	100	33,3	0,008

Tabla 14. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Complejo parabraquial

La solución salina indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. Al analizar la distribución lateromedial de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo

parabraquial lateral, localizándose a este nivel el 71,2% de las neuronas ipsilaterales y el 59,9% de las neuronas contralaterales (Tabla 15). El número de neuronas c-fos positivas fue estadísticamente mayor en el núcleo parabraquial lateral ipsilateral que en el contralateral; mientras que en el núcleo de Kölliker-Fuse y en el núcleo parabraquial medial ipsilateral se halló significativamente menos inmunorreactividad de c-fos que en el lado contralateral (Tabla 15). La expresión de c-fos en el tercio rostral del núcleo parabraquial lateral se localizó principalmente en su región lateroexterna. Por el contrario, en los dos tercios caudales del núcleo parabraquial lateral y en toda la extensión rostrocaudal del núcleo de Kölliker-Fuse y del núcleo parabraquial medial, las neuronas activadas por la solución salina se distribuyeron uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión de dichos núcleos.

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	652	71,2	59	454	59,9	41	<0,001
Kölliker-Fuse	130	14,2	44,2	164	21,6	55,8	<0,001
Parabraquial medial	134	14,6	48,9	140	18,5	51,1	0,003
TOTAL	916±232,1	100	54,7	758±198,3	100	45,3	<0,001

Tabla 15. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por la solución salina. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

b) Aceite mineral

La inyección de aceite mineral en la región de las vibrisas indujo inmunorreactividad de c-fos en los núcleos interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales ventral y dorsal, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial. La expresión de c-fos en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar, en el núcleo caudal y en el asta dorsal del primer segmento cervical fue significativamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral. Por el contrario, en el resto de las estructuras no se hallaron diferencias estadísticas entre ambos lados.

Núcleo principal del trigémino

La estimulación con aceite mineral no indujo ninguna expresión de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

La inyección de aceite mineral en la región de las vibrisas no indujo ninguna inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral ipsilateral ni contralateral.

Núcleo interpolar del trigémino

El aceite mineral indujo inmunorreactividad de c-fos únicamente en la división ventral del núcleo interpolar. Mientras que en el lado ipsilateral la expresión de c-fos se localizó principalmente en el tercio medio y en la zona rostral del tercio caudal del núcleo oral ventral (75% de las neuronas), en el lado contralateral las neuronas c-fos positivas se situaron fundamentalmente en los polos rostral y caudal del mismo (66,6% de las neuronas) (Tabla 16). A pesar de que la inmunorreactividad de c-fos fue similar

NÚCLEO INTERPOLAR				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0	2	33,3
Segundo	1	12,5	1	16,7
Tercero	2	25	1	16,7
Cuarto	2	25	0	0
Quinto	2	25	0	0
Sexto	1	12,5	2	33,3
TOTAL	8±1,2	100	6±0,5	100

Tabla 16. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

en el núcleo interpolar ventral ipsilateral y contralateral, en el núcleo ipsilateral fueron excitadas significativamente más neuronas que en el núcleo contralateral en el cuarto y quinto nivel (Tabla 17). Aunque los dibujos de cámara clara (Figs. 13B-D) no demuestran la presencia de neuronas c-fos positivas en el núcleo interpolar, en los restantes animales donde fue estudiada la expresión de c-fos tras la inyección de aceite mineral se observó que ésta se distribuía anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo interpolar ventral.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	ND	0	0	2	100	0,225
Segundo	0	0	0	0	ND	1	50	1	50	ND
Tercero	0	0	0	0	ND	2	66,7	1	33,3	0,456
Cuarto	0	0	0	0	ND	2	100	0	0	0,038
Quinto	0	0	0	0	ND	2	100	0	0	0,038
Sexto	0	0	0	0	ND	1	33,3	2	66,7	0,456
TOTAL	0	0	0	0	ND	8±1,2	57,1	6±0,5	42,9	0,707

Tabla 17. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

El aceite mineral indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1) (Figs. 13E-H). A pesar de que la expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral en las 5 láminas dorsales de Rexed, únicamente se hallaron diferencias estadísticas entre ambos lados en las láminas I-II (Tabla 18). Al estudiar la distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas se constató que éstas eran más numerosas en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 78,6% de las neuronas ipsilaterales y el 65,5% de las neuronas contralaterales (Tabla 18). Los dibujos de cámara clara (Figs. 13E-H) muestran que la inmunorreactividad de c-fos se localizó principalmente en toda la extensión dorsoventral de la lámina I de Rexed.

Láminas	NÚCLEO CAUDAL Y C1						
	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	p
I y II	316	78,6	80,1	131	65,5	19,9	<0,001
III	28	7	80	16	8	20	0,122
IV	13	3,2	80,2	12	6	19,8	0,225
V	45	11,2	80,1	41	20,5	19,9	0,368
TOTAL	402±122,2	100	66,8	200±87,6	100	33,2	<0,001

Tabla 18. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

A la altura del núcleo oral, el aceite mineral indujo escasa expresión de c-fos en la formación reticular ventral, localizándose tanto a nivel ipsilateral como contralateral principalmente en el tercio caudal de la formación reticular ventral (57,1% a nivel ipsilateral; 100% a nivel contralateral) (Tabla 19). El número de neuronas c-fos positivas fue similar en ambos lados, no hallándose diferencias significativas entre ambos en ningún nivel (Tabla 19). Aunque los dibujos de cámara clara (Fig. 13A) prácticamente no demuestran inmunorreactividad de c-fos en la formación reticular ventral, en los restantes animales donde fue estudiada la expresión de c-fos tras la inyección de aceite mineral se observó que ésta se distribuía anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión de la misma.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	1	14,3	100	0	0	0	0,183
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	1	14,3	100	0	0	0	0,183
Cuarto	1	14,3	100	0	0	0	0,183
Quinto	0	0	0	0	0	0	ND
Sexto	0	0	0	0	0	0	ND
Séptimo	1	14,3	25	3	60	75	0,074
Octavo	3	42,8	60	2	40	40	0,456
TOTAL	7±1,1	100	58,3	5±0,3	100	41,7	0,625

Tabla 19. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

A la altura del núcleo interpolar, después de la inyección de aceite mineral, se registró inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se concentraron en el tercio caudal de la formación reticular ventral (56,3% en el lado ipsilateral; 42,5% en el lado contralateral) (Tabla 20). A pesar de que el número de neuronas con expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, las diferencias entre ambos únicamente fueron estadísticas en el sexto nivel (Tabla 20). Los dibujos de cámara clara (Figs. 13B-D) muestran que la inmunorreactividad de c-fos se localizó, casi de manera exclusiva, medialmente a la región más ventral del tracto trigeminal espinal y del núcleo interpolar.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	9	16,4	52,9	8	17	47,1	0,762
Segundo	5	9,1	50	5	10,7	50	ND
Tercero	5	9,1	45,5	6	12,8	54,5	0,225
Cuarto	5	9,1	38,5	8	17	61,5	0,551
Quinto	5	9,1	55,6	4	8,5	44,4	0,578
Sexto	26	47,2	61,9	16	34	38,1	0,049
TOTAL	55±6,6	100	53,9	47±5,9	100	46,1	0,039

Tabla 20. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

La inyección de aceite mineral en la región de las vibrisas no indujo ninguna expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral.

Por el contrario, la inmunorreactividad de c-fos fue patente de manera bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Aunque en ambos lados, y de manera general, las neuronas c-fos positivas se distribuyeron de manera uniforme en sentido rostrocaudal, se constató una ligera tendencia a situarse en el tercio caudal (61,1% en el lado ipsilateral; 43,8% en el lado contralateral) (Tabla 21). El número de neuronas que presentaron expresión de c-fos fue similar en ambos lados, siendo la diferencia entre ambos únicamente significativa en el cuarto nivel (Tabla 21). Los dibujos de cámara clara (Figs. 13B-D) muestran que las neuronas excitadas por el aceite mineral se localizaron principalmente en la región ventral del núcleo paratrigeminal ventral.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	1	5,6	50	1	6,2	50	ND
Segundo	2	11	50	2	12,4	50	ND
Tercero	3	16,7	50	3	18,8	50	ND
Cuarto	1	5,6	25	3	18,8	75	0,038
Quinto	6	33,3	66,7	3	18,8	33,3	0,551
Sexto	5	27,8	55,6	4	25	44,4	0,225
TOTAL	18±2,3	100	52,9	16±2	100	47,1	0,762

Tabla 21. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo paratrigeminal dorsal

El aceite mineral apenas indujo expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal dorsal. Las neuronas c-fos positivas se registraron fundamentalmente en los dos tercios caudales del núcleo (88,8% a nivel ipsilateral; 100% a nivel contralateral) (Tabla 22). La inmunorreactividad de c-fos fue mayor en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos únicamente en el quinto nivel (Tabla 22). Los dibujos de cámara clara (Figs. 13B-D) muestran que la expresión de c-fos se situó principalmente en la región dorsal del núcleo paratrigeminal dorsal.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	1	11,2	100	0	0	0	0,183
Tercero	2	22,2	66,7	1	25	33,3	0,183
Cuarto	0	0	0	0	0	0	ND
Quinto	3	33,3	100	0	0	0	0,035
Sexto	3	33,3	50	3	75	50	ND
TOTAL	9±1,1	100	69,2	4±0,9	100	30,8	0,069

Tabla 22. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Complejo parabraquial

El aceite mineral indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en casi toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. Al analizar la distribución lateromedial de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo parabraquial lateral, localizándose a este nivel el 72,6% de las neuronas ipsilaterales y el 78,8% de las neuronas contralaterales (Tabla 23). El número de neuronas c-fos positivas

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	156	72,6	47,1	175	78,8	52,9	0,189
Kölliker-Fuse	34	15,8	53,1	30	13,5	46,9	0,71
Parabraquial medial	25	11,6	59,5	17	7,7	40,5	0,137
TOTAL	215±65,9	100	49,2	222±71,5	100	50,8	0,218

Tabla 23. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite mineral. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

fue similar en ambos lados, no hallándose ninguna diferencia significativa entre ellos en ninguno de los tres núcleos del complejo parabraquial analizados (Tabla 23). Las neuronas que respondieron a la inyección de aceite mineral se distribuyeron uniformemente en toda la extensión dorsoventral y lateromedial de los tres núcleos del complejo parabraquial estudiados.

c) Anestesia

Los cobayas que fueron anestesiados pero a los cuales no se les inyectó ninguna sustancia en la región de las vibrisas presentaron inmunorreactividad de c-fos en los núcleos interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales ventral y dorsal, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial. La expresión de c-fos en el núcleo caudal, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial fue significativamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral, observándose el efecto contrario en el núcleo paratrigeminal dorsal. En el resto de las estructuras donde hallamos neuronas c-fos positivas no encontramos diferencias estadísticas entre ambos lados.

Núcleo principal del trigémino

Los cobayas que únicamente fueron anestesiados no presentaron ninguna expresión de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

En los cobayas que fueron anestesiados y a los cuales no se les inyectó ninguna sustancia en la región de las vibrisas no se observó ninguna neurona c-fos positiva en el núcleo oral del trigémino ipsilateral o contralateral.

Núcleo interpolar del trigémino

Los cobayas que únicamente fueron anestesiados apenas presentaron expresión de c-fos en el núcleo interpolar. Mientras que en el núcleo interpolar ipsilateral la inmunorreactividad de c-fos se distribuyó uniformemente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo, en el núcleo interpolar contralateral ésta tendió a situarse

principalmente en el tercio medio (50% de las neuronas) (Tabla 24). Al analizar la distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas, se registró una mayor presencia en la división ventral que en la dorsal del núcleo interpolar, localizándose concretamente todas las neuronas del núcleo interpolar contralateral en la división ventral. El análisis estadístico determinó una presencia significativamente mayor de neuronas con expresión de c-fos en el núcleo interpolar ventral contralateral que en el ipsilateral en el primer y tercer nivel, y en el núcleo interpolar dorsal ipsilateral que en el contralateral en el cuarto nivel (Tabla 25). La inmunorreactividad de c-fos se distribuyó anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo interpolar.

NÚCLEO INTERPOLAR				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0	2	16,7
Segundo	2	33,3	1	8,3
Tercero	0	0	5	41,7
Cuarto	2	33,3	1	8,3
Quinto	0	0	1	8,3
Sexto	2	33,3	2	16,7
TOTAL	6±0,7	100	12±1,4	100

Tabla 24. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	ND	0	0	2	100	0,038
Segundo	0	0	0	0	ND	2	66,7	1	33,3	0,057
Tercero	0	0	0	0	ND	0	0	5	100	0,005
Cuarto	2	100	0	0	0,038	0	0	1	100	0,183
Quinto	0	0	0	0	ND	0	0	1	100	0,183
Sexto	0	0	0	0	ND	2	50	2	50	ND
TOTAL	2±0,2	100	0	0	0,057	4±0,5	25	12±1,4	75	0,055

Tabla 25. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

La anestesia indujo expresión de c-fos bilateral en casi toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del

primer segmento cervical (C1). La inmunorreactividad de c-fos en las láminas I-II, III y V fue estadísticamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral, mientras que en la lámina IV se observó lo contrario (Tabla 26). Al estudiar la distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas se constató una mayor presencia en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 71,8% de las neuronas ipsilaterales y el 68% de las neuronas contralaterales (Tabla 26). La inmunorreactividad de c-fos se localizó principalmente en toda la extensión dorsoventral de la lámina I de Rexed.

NÚCLEO CAUDAL Y C1							
Láminas	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	p
I y II	122	71,8	46,6	140	68	53,4	<0,001
III	8	4,7	25	24	11,7	75	<0,001
IV	4	2,4	100	0	0	0	0,006
V	36	21,2	46,2	42	20,4	53,8	0,003
TOTAL	170±67,1	100	45,2	206±71,1	100	54,8	0,003

Tabla 26. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

En los cobayas que únicamente fueron anestesiados prácticamente no se observó ninguna expresión de c-fos en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 27). La expresión de c-fos se distribuyó anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda su extensión.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	1	50	100	0,183
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	0	0	0	1	50	100	0,183
Cuarto	0	0	0	0	0	0	ND
Quinto	0	0	0	0	0	0	ND
Sexto	0	0	0	0	0	0	ND
Séptimo	0	0	0	0	0	0	ND
Octavo	1	100	100	0	0	0	0,057
TOTAL	1±0,1	100	33,3	2±0,1	100	66,7	0,529

Tabla 27. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Por el contrario, se registró inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar. Al analizar la distribución rostrocaudal de la expresión de c-fos se observó una tendencia a concentrarse principalmente en el tercio caudal de la formación reticular ventral (57,9% en el lado ipsilateral; 40,6% en el lado contralateral) (Tabla 28). Aunque el número de neuronas c-fos positivas fue similar en ambos lados, en el primer nivel de la formación reticular ventral contralateral se registró un mayor número de neuronas que en el lado ipsilateral, de la misma forma que en el sexto nivel de la formación reticular ventral ipsilateral la inmunorreactividad de c-fos fue significativamente mayor que en el lado contralateral (Tabla 28). La expresión de c-fos se localizó, casi de manera exclusiva, medialmente a la región más ventral del tracto trigeminal espinal y del núcleo interpolar.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	4	10,5	33,3	8	25	66,7	0,008
Segundo	2	5,3	40	3	9,4	60	0,183
Tercero	4	10,5	57,1	3	9,4	42,9	0,057
Cuarto	6	15,8	54,5	5	15,6	45,5	0,057
Quinto	8	21,1	47,1	9	28,1	52,9	0,183
Sexto	14	36,8	77,8	4	12,5	22,2	0,001
TOTAL	38±8,2	100	54,3	32±8	100	45,7	0,15

Tabla 28. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

Los cobayas que fueron anestesiados y a los cuales no se les inyectó ninguna sustancia en la región de las vibrisas, no presentaron ninguna neurona c-fos positiva en el núcleo paratrigeminal rostral.

En el núcleo paratrigeminal ventral, la escasa inmunorreactividad de c-fos registrada se observó prácticamente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo bilateralmente. Mientras que en el lado contralateral las neuronas con expresión de c-fos se distribuyeron de manera bastante uniforme en sentido rostrocaudal, en el lado ipsilateral tendieron a concentrarse en el tercio caudal del núcleo (63,7% de las neuronas) (Tabla 29). El número de neuronas c-fos positivas fue mayor en el núcleo ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados

en la mitad caudal del núcleo (Tabla 29). La inmunorreactividad de c-fos se distribuyó anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal ventral.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	2	9,1	50	2	25	50	ND
Segundo	0	0	0	1	12,5	100	0,183
Tercero	4	18,2	57,1	3	37,5	42,9	0,057
Cuarto	2	9,1	100	0	0	0	0,038
Quinto	8	36,4	100	0	0	0	0,002
Sexto	6	27,3	75	2	25	25	0,006
TOTAL	22±6,9	100	73,3	8±1,2	100	26,7	0,059

Tabla 29. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo paratrigeminal dorsal

La anestesia indujo escasa expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal dorsal, la cual se distribuyó aleatoriamente por toda la extensión rostrocaudal del núcleo (Tabla 30). La inmunorreactividad de c-fos fue significativamente mayor en el núcleo paratrigeminal dorsal contralateral que en el ipsilateral en el primer y cuarto nivel; mientras que las neuronas c-fos positivas fueron estadísticamente más numerosas en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral en el tercer y sexto nivel (Tabla 30). La expresión de c-fos se distribuyó anárquicamente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal dorsal.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	2	50	100	0,038
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	4	66,7	100	0	0	0	0,006
Cuarto	0	0	0	2	50	100	0,038
Quinto	0	0	0	0	0	0	ND
Sexto	2	33,3	100	0	0	0	0,02
TOTAL	6±0,8	100	60	4±0,7	100	40	0,02

Tabla 30. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Complejo parabraquial

En los cobayas que fueron anestesiados y a los cuales no se les inyectó ninguna sustancia en la región de las vibrisas se observó inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. Al analizar la distribución lateromedial de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo parabraquial lateral, localizándose a este nivel el 77,6% de las neuronas ipsilaterales y el 74,3% de las neuronas contralaterales (Tabla 31). El número de neuronas c-fos positivas en los tres núcleos analizados fue significativamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral (Tabla 31). La inmunorreactividad de c-fos se distribuyó uniformemente en toda la extensión dorsoventral y lateromedial de los tres núcleos del complejo parabraquial estudiados.

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	118	77,6	45,4	142	74,3	54,6	<0,001
Kölliker-Fuse	20	13,2	42,6	27	14,1	57,4	0,002
Parabraquial medial	14	9,2	38,9	22	11,5	61,1	0,002
TOTAL	152±54,4	100	44,3	191±59,1	100	55,7	<0,001

Tabla 31. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales de los cobayas que únicamente fueron anestesiados. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

4.3.2. Aceite de mostaza

El aceite de mostaza inmediatamente tras ser inyectado, indujo claros signos de inflamación en la zona de las vibrisas, tales como edema y enrojecimiento, y los cuales aún fueron manifiestos en el momento de realizar la perfusión. Igualmente, los cobayas respondieron a la inyección de dicho irritante químico mediante reacciones reflejas nociceptivas, principalmente con el frotamiento del área de inyección con las patas anteriores.

El aceite de mostaza, tal y como se muestra en los dibujos de cámara clara de secciones transversales del tronco encefálico y médula espinal cervical (Figs. 14A-L), indujo inmunorreactividad de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, en el núcleo intertrigeminal, en la formación reticular ventral colindante con los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial. La expresión de c-fos en el núcleo oral

dorsal, en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral, en los núcleos paratrigeminales rostral y ventral y en el complejo parabraquial no presentó diferencias significativas entre ambos lados. Por el contrario, el número de neuronas c-fos positivas en el núcleo interpolar dorsal fue estadísticamente mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral, observándose el efecto inverso en el resto de las estructuras donde se halló inmunorreactividad de c-fos.

Núcleo principal del trigémino

El aceite de mostaza únicamente indujo inmunorreactividad de c-fos ipsilateral en el núcleo principal del trigémino y en el núcleo intertrigeminal (Tabla 32). La escasa expresión de c-fos registrada se localizó en el tercio medio y en la zona rostral del tercio caudal de dichos núcleos. Las neuronas que fueron activadas por el aceite de mostaza se situaron preferentemente en la región ventromedial del núcleo principal ventral y en la región ventrolateral del núcleo intertrigeminal (Figs. 8D y 14A).

NÚCLEO PRINCIPAL					NÚCLEO INTERTRIGEMINAL				
IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
X±SEM	%IL	X±SEM	%CL	p	X±SEM	%IL	X±SEM	%CL	p
20±4,3	100	0	0	<0,001	38±7,7	100	0	0	<0,001

Tabla 32. Neuronas c-fos positivas en el núcleo principal del trigémino y en el núcleo intertrigeminal. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo oral del trigémino

El aceite de mostaza indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo (67,3% a nivel ipsilateral; 82% a nivel contralateral) (Tabla 33). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en la división ventral que en la división dorsal del núcleo oral, especialmente a nivel ipsilateral. La expresión de c-fos fue significativamente mayor en el núcleo oral ventral ipsilateral que en el contralateral en los niveles tercero, sexto, séptimo y octavo. Por el contrario, el número de neuronas c-fos positivas en el núcleo oral dorsal sólo fue estadísticamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral en el octavo nivel (Tabla 34). Las neuronas del núcleo oral que respondieron a la inyección de aceite de mostaza se situaron fundamentalmente en la zona ventromedial y ventrolateral del

núcleo oral ventral (Figs. 9A-B y 14B-E) y en la región más dorsal del núcleo oral dorsal (Figs. 14C-D).

NÚCLEO ORAL				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	5	1,4	1	2
Segundo	15	4,3	1	2
Tercero	23	6,6	2	4
Cuarto	32	9,2	2	4
Quinto	39	11,2	3	6
Sexto	75	21,5	9	18
Séptimo	96	27,5	16	32
Octavo	64	18,3	16	32
TOTAL	349±111	100	50±3,2	100

Tabla 33. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Nivel	NÚCLEO ORAL DORSAL					NÚCLEO ORAL VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	1	100	0	0	0,215	4	80	1	20	0,109
Segundo	6	85,7	1	14,3	0,325	9	100	0	0	0,057
Tercero	7	87,5	1	12,5	0,125	16	94,1	1	5,9	0,038
Cuarto	6	100	0	0	0,066	26	92,9	2	7,1	0,063
Quinto	6	85,7	1	14,3	0,067	33	94,3	2	5,7	0,074
Sexto	15	75	5	25	0,165	60	93,8	4	6,3	0,002
Séptimo	9	60	6	40	0,501	87	89,7	10	10,3	0,022
Octavo	5	83,3	1	16,7	0,016	59	79,7	15	20,3	0,011
TOTAL	55±4,3	78,6	15±1,4	21,4	0,068	294±122	89,4	35±6,4	10,6	0,017

Tabla 34. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo interpolar del trigémino

El aceite de mostaza indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo (65,5% a nivel ipsilateral; 42,7% a nivel contralateral) (Tabla 35). Al igual que se comentó en relación con el núcleo oral, la inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en la división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolar. Aunque en el núcleo interpolar ventral, la expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en contralateral, el análisis estadístico únicamente reveló diferencias significativas entre ambos lados en el quinto

nivel (Tabla 36). Las neuronas c-fos positivas del núcleo interpolador ventral se situaron fundamentalmente en el borde lateral, próximo al tracto trigeminal espinal, y en el borde medial, adyacente a la formación reticular (Figs. 10A,E y 4F-H).

NÚCLEO INTERPOLAR				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	17	8,6	12	7,3
Segundo	13	6,6	27	16,5
Tercero	13	6,6	30	18,3
Cuarto	25	12,7	25	15,2
Quinto	75	38,1	42	25,6
Sexto	54	27,4	28	17,1
TOTAL	197±87,2	100	164±74,3	100

Tabla 35. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL p	IL		CL		IL vs CL p
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}		X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	
Primero	1	25	3	75	0,252	16	64	9	36	0,072
Segundo	3	33,3	6	66,7	0,23	10	32,3	21	67,7	0,158
Tercero	3	33,3	6	66,7	0,416	10	29,4	24	70,6	0,162
Cuarto	3	42,9	4	57,1	0,215	22	51,2	21	48,8	0,67
Quinto	8	50	8	50	0,919	67	66,3	34	33,7	0,024
Sexto	5	83,3	1	16,7	0,26	49	64,5	27	35,5	0,155
TOTAL	23±4,7	45,1	28±5,9	54,9	0,006	174±54,3	56,1	136±44,2	43,9	<0,001

Tabla 36. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

El aceite de mostaza indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1) (Figs. 14I-L). Dicha inmunorreactividad fue más manifiesta en el lado ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados en las 5 láminas dorsales (Tabla 37). Al analizar la distribución dorsoventral de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en las dos láminas más superficiales, localizándose a este nivel el 82,6% de las neuronas ipsilaterales y el 68,8% de las neuronas contralaterales (Tabla 37). Las neuronas del núcleo caudal y de C1 que respondieron a la inyección de aceite de mostaza se situaron

fundamentalmente en los dos tercios ventrales de las láminas I y IIo (Figs. 11A-B y 14I-L).

NÚCLEO CAUDAL Y C1							
Láminas	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	p
I y II	3447	82,6	81,5	784	68,8	18,5	0,021
III	296	7,1	70,5	124	10,9	29,5	0,005
IV	133	3,2	65,8	69	6,1	34,2	0,005
V	295	7,1	64,4	163	14,3	35,6	0,002
TOTAL	4171±631,2	100	78,5	1140±391,6	100	21,5	0,007

Tabla 37. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

El aceite de mostaza indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente tanto al núcleo oral (Tabla 38) como al núcleo interpolar (Tabla 39) del trigémino. La inmunorreactividad de c-fos fue bastante uniforme a lo largo de la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral, siendo destacable el aumento de neuronas c-fos positivas observado en la región caudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral ipsilateral (Tabla 38) y en la mitad caudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar contralateral (Tabla 39). El número de neuronas con expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, a pesar de que las diferencias únicamente fueron

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	9	2,2	75	3	3,3	25	0,147
Segundo	32	7,9	72,7	12	13,3	27,3	0,045
Tercero	27	6,7	58,7	19	21,1	41,3	0,059
Cuarto	71	17,6	82,6	15	16,7	17,4	0,002
Quinto	42	10,4	84	8	8,9	16	0,068
Sexto	40	9,9	87	6	6,7	13	0,064
Séptimo	53	13,1	84,1	10	11,1	15,9	0,108
Octavo	130	32,2	88,4	17	18,9	11,6	0,091
TOTAL	404±119,5	100	81,8	90±31	100	18,2	0,055

Tabla 38. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

significativas en el segundo y cuarto nivel a la altura del núcleo oral (Tabla 38) y en el segundo y quinto nivel a la altura del núcleo interpolar (Tabla 39). Las neuronas de la formación reticular ventral que fueron activadas tras la inyección de este irritante químico se localizaron inmediatamente medial a los núcleos oral e interpolar ventral. Igualmente, en el cuarto caudal del núcleo oral y en toda la extensión del núcleo interpolar, las neuronas c-fos positivas también se localizaron medialmente a la región más ventral del tracto trigeminal espinal (Figs. 9A-B, 10A y 14B-H).

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	108	13,8	75,5	35	8,8	24,5	0,077
Segundo	117	14,9	80,7	28	7	19,3	0,049
Tercero	143	18,3	69,4	63	15,8	30,6	0,2
Cuarto	135	17,2	61,9	83	20,9	38,1	0,157
Quinto	179	22,9	62,4	108	27,1	37,6	0,035
Sexto	101	12,9	55,5	81	20,4	44,5	0,399
TOTAL	783±216,5	100	66,3	398±101,4	100	33,7	0,016

Tabla 39. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

El aceite de mostaza únicamente indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en el tercio caudal del núcleo paratrigeminal rostral, no observándose ninguna expresión de c-fos en los dos tercios rostrales de ambos lados (Tabla 40). El número de neuronas c-fos positivas en los tres niveles caudales del núcleo paratrigeminal rostral fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, a pesar de que las diferencias únicamente fueron estadísticas en el octavo nivel (Tabla 40).

Por el contrario, la inmunorreactividad de c-fos fue patente de manera bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se situaron en la mitad caudal del núcleo (81,3% a nivel ipsilateral; 89,2% a nivel contralateral) (Tabla 41). El número de neuronas que presentaron expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias significativas únicamente en el tercer nivel (Tabla 41). Las neuronas que fueron activadas tras la inyección de este irritante químico se localizaron principalmente en la región más medial de los núcleos paratrigeminales

rostral y ventral, en estrecha proximidad con el núcleo oral e interpoler (Figs. 10E y 14D-H).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	0	0	0	0	0	0	ND
Cuarto	0	0	0	0	0	0	ND
Quinto	0	0	0	0	0	0	ND
Sexto	21	34,4	95,5	1	7,6	4,5	0,391
Séptimo	29	47,5	82,9	6	46,2	17,1	0,101
Octavo	11	18,1	64,7	6	46,2	35,3	0,029
TOTAL	61±10,3	100	82,4	13±0,2	100	17,6	0,068

Tabla 40. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	5	1,6	62,5	3	1,2	37,5	0,252
Segundo	18	5,7	64,3	10	4	35,7	0,283
Tercero	36	11,4	72	14	5,6	28	0,023
Cuarto	87	27,4	64	49	19,8	36	0,212
Quinto	96	30,3	61,1	61	24,6	38,9	0,331
Sexto	75	23,6	40,3	111	44,8	59,7	0,541
TOTAL	317±97,4	100	56,1	248±79,4	100	43,9	0,067

Tabla 41. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo paratrigeminal dorsal

El aceite de mostaza indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal dorsal, salvo en la zona más rostral del lado contralateral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en la mitad caudal del núcleo (70,4% a nivel ipsilateral; 86,2% a nivel contralateral) (Tabla 42). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados en el tercer, quinto y sexto nivel (Tabla 42). La

inmunorreactividad de c-fos tras la inyección de este irritante químico se distribuyó uniformemente por todo el núcleo paratrigeminal dorsal (Fig. 10B).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	2	2,8	100	0	0	0	0,252
Segundo	6	8,5	85,7	1	2	14,3	0,178
Tercero	13	18,3	68,4	6	11,8	31,6	0,046
Cuarto	17	23,9	47,2	19	37,2	52,8	0,367
Quinto	18	25,4	56,2	14	27,4	43,8	0,044
Sexto	15	21,1	57,7	11	21,6	42,3	0,007
TOTAL	71±16,4	100	58,2	51±11,2	100	41,8	0,001

Tabla 42. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Complejo parabraquial

El aceite de mostaza indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. El número de neuronas c-fos positivas fue similar en ambos lados, no existiendo diferencias significativas entre ellos en ninguno de los núcleos estudiados en dicho complejo (Tabla 43). Al analizar la distribución lateromedial de la inmunorreactividad de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo parabraquial lateral, situándose a este nivel el 75,1% de las neuronas ipsilaterales y el 75,3% de las neuronas contralaterales (Tabla 43). La inmunorreactividad de c-fos se localizó en toda la extensión del núcleo parabraquial lateral, del núcleo parabraquial medial y del núcleo de Kölliker-Fuse (Fig. 8C).

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	900	75,1	55,3	727	75,3	44,7	0,087
Kölliker-Fuse	123	10,3	49,4	126	13,1	50,6	0,783
Parabraquial medial	176	14,6	61,1	112	11,6	38,9	0,058
TOTAL	1199±315	100	55,4	965±193	100	44,6	0,081

Tabla 43. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

4.3.3. Formalina

La formalina indujo los mismos signos de inflamación local así como las reacciones nociceptivas observadas después de la inyección de aceite de mostaza. Igualmente, tras la aplicación de este irritante químico se constató la presencia de expresión de c-fos en los núcleos oral, interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial.

Núcleo principal del trigémino

La inyección de formalina en la región de las vibrisas no indujo ninguna inmunorreactividad de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

La formalina indujo expresión de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral ipsilateral. Al analizar la distribución dorsoventral de la inmunorreactividad de c-fos se constató que ésta era mayor en la división ventral que en la división dorsal del núcleo oral. Mientras que en el núcleo oral dorsal las neuronas c-fos positivas se distribuyeron uniformemente en los dos tercios caudales del núcleo, en el núcleo oral ventral las neuronas se localizaron principalmente en el tercio caudal del mismo, próximas a la región de transición con el núcleo interpolar (59% de las neuronas) (Tabla 44). La expresión de c-fos se observó en el núcleo oral ventral, principalmente en la región ventromedial del mismo (Fig. 9C).

Núcleo interpolar del trigémino

La formalina indujo inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar ipsilateral. La expresión de c-fos fue mayor en la división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolar. Aunque en general, las neuronas c-fos positivas se distribuyeron de manera uniforme en sentido rostrocaudal en las dos divisiones del núcleo interpolar, se constató una ligera tendencia a situarse en el tercio caudal en ambos casos (47,6% de las neuronas del núcleo interpolar dorsal; 48,8% de las neuronas del núcleo interpolar ventral) (Tabla 45). La inmunorreactividad

de c-fos se registró fundamentalmente en la región más ventral del núcleo interpolar ventral, extendiéndose ligeramente dicha inmunorreactividad de también en su borde medial en la región caudal del núcleo interpolar.

Nivel	NÚCLEO ORAL	NÚCLEO ORAL DORSAL		NÚCLEO ORAL VENTRAL	
	X±SEM	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	10	0	0	10	6,7
Segundo	13	0	0	13	8,7
Tercero	8	0	0	8	5,4
Cuarto	23	8	23,5	15	10,1
Quinto	24	9	26,5	15	10,1
Sexto	39	9	26,5	30	20,1
Séptimo	48	6	17,6	42	28,2
Octavo	18	2	5,9	16	10,7
TOTAL	183±57,3	34±10,3	100	149±47,6	100

Tabla 44. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL		NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL	
	X±SEM	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	19	2	9,5	17	13,6
Segundo	6	0	0	6	4,8
Tercero	26	5	23,8	21	16,8
Cuarto	24	4	19	20	16
Quinto	26	2	9,5	24	19,2
Sexto	45	8	38,1	37	29,6
TOTAL	146±69,8	21±3,6	100	125±31	100

Tabla 45. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

La inyección de formalina indujo expresión de c-fos ipsilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1). Al estudiar la distribución dorsoventral de la inmunorreactividad de c-fos, se constató que ésta era mayor en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 70% de las neuronas (Tabla 46). Las neuronas c-fos positivas se localizaron principalmente en los dos tercios ventrales de las láminas I y Ilo del núcleo caudal y del asta dorsal de C1.

NÚCLEO CAUDAL Y C1		
Láminas	X±SEM	% _{D-V}
I y II	868	70
III	184	14,8
IV	45	3,6
V	143	11,5
TOTAL	1240±351,6	100

Tabla 46. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

La formalina indujo inmunorreactividad de c-fos ipsilateralmente en los tres cuartos caudales de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 47) y en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 48). Mientras que a la altura del núcleo oral, la expresión de c-fos tendía a localizarse principalmente en el cuarto caudal de la formación reticular (59,9% de las neuronas) (Tabla 47); a la altura del núcleo interpolar, las neuronas c-fos positivas se distribuyeron uniformemente a lo largo de toda su extensión rostrocaudal (Tabla 48). En los dos tercios rostrales de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral, la inmunorreactividad de c-fos se localizó sólo medialmente al núcleo oral ventral. Por el contrario, en el tercio caudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral y en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar, la expresión de c-fos se situó medialmente al núcleo trigeminal y a la región más ventral del tracto trigeminal espinal (Fig. 9C).

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0
Segundo	0	0
Tercero	22	15,5
Cuarto	11	7,7
Quinto	10	7
Sexto	14	9,9
Séptimo	41	28,9
Octavo	44	31
TOTAL	142±49,8	100

Tabla 47. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	59	18,2
Segundo	42	12,9
Tercero	51	15,7
Cuarto	38	11,7
Quinto	56	17,2
Sexto	79	24,3
TOTAL	325±86,4	100

Tabla 48. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

La formalina únicamente indujo expresión de c-fos en el tercio caudal del núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral (Tabla 49). Las neuronas activadas por dicho irritante se localizaron en la región más ventromedial del núcleo paratrigeminal rostral.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0
Segundo	0	0
Tercero	0	0
Cuarto	0	0
Quinto	0	0
Sexto	4	14,8
Séptimo	18	66,7
Octavo	5	18,5
TOTAL	27±4,7	100

Tabla 49. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

La inmunorreactividad de c-fos se registró ipsilateralmente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se situaron en el tercio caudal del núcleo (76,9% de las neuronas) (Tabla 50). La expresión de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal ventral, aunque con una ligera tendencia a concentrarse principalmente en los dos tercios ventrales de dicho núcleo.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	4	1,9
Segundo	12	5,7
Tercero	16	7,5
Cuarto	17	8
Quinto	86	40,6
Sexto	77	36,3
TOTAL	212±54,3	100

Tabla 50. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

Núcleo paratrigeminal dorsal

La formalina indujo inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo (67,2% de las neuronas) (Tabla 51). La expresión de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal dorsal.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	2	3,4
Segundo	4	6,9
Tercero	5	8,6
Cuarto	8	13,8
Quinto	25	43,1
Sexto	14	24,1
TOTAL	58±9,4	100

Tabla 51. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la formalina.

4.3.4. Capsaicina

La capsaicina, al igual que el aceite de mostaza y la formalina, inmediatamente tras ser inyectada indujo claros signos de inflamación en la zona de las vibrisas, tales como edema y enrojecimiento, que aún fueron manifiestos en el momento de realizar la perfusión. Sin embargo, a diferencia de aquellos, los cobayas no respondieron a la aplicación de dicho irritante químico mediante reacciones reflejas nociceptivas.

La capsaicina tras su inyección indujo expresión de c-fos en los núcleos oral, interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los

núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial.

Núcleo principal del trigémino

La inyección de capsaicina en la región de las vibrisas no indujo ninguna inmunorreactividad de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

La capsaicina indujo expresión de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral ipsilateral. Al analizar la distribución dorsoventral de la inmunorreactividad de c-fos se constató que ésta era mayor en la división ventral que en la división dorsal del núcleo oral. En el núcleo oral dorsal las neuronas c-fos positivas se localizaron principalmente en el tercio medio y en la zona rostral del tercio caudal del núcleo (78,9% de las neuronas). Por el contrario, la expresión de c-fos en el núcleo oral ventral se observó fundamentalmente en el tercio caudal del núcleo (56,3% de las neuronas) (Tabla 52). Las neuronas que respondieron a la inyección de capsaicina se situaron principalmente en el borde ventrolateral del núcleo oral ventral, en cercana proximidad al tracto trigeminal espinal, y en menor medida también en su borde ventromedial (Fig. 9D).

Nivel	NÚCLEO ORAL	NÚCLEO ORAL DORSAL		NÚCLEO ORAL VENTRAL	
	X±SEM	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	10	0	0	10	5,3
Segundo	17	1	5,3	16	8,4
Tercero	14	1	5,3	13	6,8
Cuarto	24	5	26,3	19	10
Quinto	30	5	26,3	25	13,2
Sexto	54	5	26,3	49	25,8
Séptimo	39	1	5,3	38	20
Octavo	21	1	5,3	20	10,5
TOTAL	209±54,7	19±3,6	100	190±42	100

Tabla 52. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

Núcleo interpolar del trigémino

La capsaicina indujo inmunorreactividad de c-fos ipsilateralmente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar. La expresión de c-fos fue más manifiesta

en la división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolar. En el núcleo interpolar dorsal, las neuronas c-fos positivas se distribuyeron principalmente en los dos tercios caudales del núcleo (84% de las neuronas). En el núcleo interpolar ventral, la inmunorreactividad de c-fos se observó fundamentalmente en el tercio caudal del mismo (56,4% de las neuronas) (Tabla 53). La expresión de c-fos se localizó principalmente en los bordes medial y lateral de la división ventral del núcleo interpolar.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL		NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL	
	X±SEM	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	15	3	12	12	9
Segundo	11	1	4	10	7,5
Tercero	26	7	28	19	14,3
Cuarto	22	5	20	17	12,8
Quinto	35	3	12	32	24,1
Sexto	49	6	24	43	32,3
TOTAL	158±55,5	25±3,8	100	133±20,4	100

Tabla 53. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

La inyección de capsaicina indujo inmunorreactividad de c-fos ipsilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1). Al estudiar la distribución dorsoventral de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 75,7% de las neuronas (Tabla 54). Las neuronas c-fos positivas se localizaron fundamentalmente en la región ventral de las láminas I y II de Rexed.

NÚCLEO CAUDAL Y C1		
Láminas	X±SEM	% _{D-V}
I y II	1266	75,7
III	217	13
IV	39	2,3
V	150	9
TOTAL	1672±361,7	100

Tabla 54. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

La capsaicina indujo expresión de c-fos en prácticamente toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral (Tabla 55) e interpolar (Tabla 56) ipsilaterales. En la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral, la inmunorreactividad de c-fos tendió a localizarse en el cuarto caudal (51,4% de las neuronas) (Tabla 55). Por el contrario, las neuronas c-fos positivas se distribuyeron uniformemente a lo largo de toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 56). La expresión de c-fos en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar se situó medialmente al núcleo trigeminal y a la región más ventral del tracto trigeminal espinal (Fig. 9D).

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0
Segundo	3	1,6
Tercero	38	20,5
Cuarto	20	10,8
Quinto	7	3,8
Sexto	22	11,9
Séptimo	37	20
Octavo	58	31,4
TOTAL	185±34,8	100

Tabla 55. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	59	21,9
Segundo	38	14,1
Tercero	56	20,7
Cuarto	41	15,2
Quinto	38	14,1
Sexto	38	14,1
TOTAL	270±74,6	100

Tabla 56. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

La capsaicina únicamente indujo expresión de c-fos en la mitad caudal del núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral (Tabla 57). Las neuronas activadas por dicho irritante se localizaron en la región más ventromedial del núcleo paratrigeminal rostral.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0
Segundo	0	0
Tercero	0	0
Cuarto	0	0
Quinto	2	5
Sexto	22	55
Séptimo	10	25
Octavo	6	15
TOTAL	40±11,2	100

Tabla 57. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

La inmunorreactividad de c-fos se registró ipsilateralmente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se situaron en el tercio caudal del núcleo (66,1% de las neuronas) (Tabla 58). La expresión de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal ventral, aunque con una ligera tendencia a concentrarse principalmente en los dos tercios ventrales de dicho núcleo.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL		
Nivel	X±SEM	% _{R-C}
Primero	8	3,5
Segundo	14	6,1
Tercero	20	8,7
Cuarto	36	15,7
Quinto	70	30,4
Sexto	82	35,7
TOTAL	230±79,8	100

Tabla 58. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

Núcleo paratrigeminal dorsal

La capsaicina indujo inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en la mitad caudal del núcleo (62,5% de las neuronas) (Tabla 59). La expresión de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión del núcleo paratrigeminal dorsal.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL		
Nivel	X±SEM	%_{R-C}
Primero	6	12,5
Segundo	6	12,5
Tercero	6	12,5
Cuarto	11	22,9
Quinto	12	25
Sexto	7	14,6
TOTAL	48±6,9	100

Tabla 59. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales activadas por la capsaicina.

4.3.5. Aceite de mostaza conjuntamente con antagonistas del sistema GABA_B

El aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno indujo los mismos signos de inflamación local así como las reacciones nociceptivas observadas después de la inyección de aceite de mostaza sin emplear ningún fármaco del sistema GABA_B. Igualmente, tras la administración de faclofeno se observó inmunorreactividad de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, en el núcleo intertrigeminal, en la formación reticular ventral colindante con los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial (Figs. 15A-L). La expresión de c-fos en el núcleo oral dorsal y en el complejo parabraquial no presentó diferencias significativas entre ambos lados. Por el contrario, el número de neuronas c-fos positivas en el resto de las estructuras fue estadísticamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral.

Núcleo principal del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo escasa inmunorreactividad de c-fos ipsilateral en el núcleo principal del trigémino y en el núcleo intertrigeminal (Tabla 60). La expresión de c-fos fue

observada en la misma localización rostrocaudal y ventrolateral que cuando únicamente se inyectó el aceite de mostaza (Fig. 15A).

NÚCLEO PRINCIPAL					NÚCLEO INTERTRIGEMINAL				
IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
25±4,9	100	0	0	<0,001	34±6,9	100	0	0	<0,001

Tabla 60. Neuronas c-fos positivas en el núcleo principal del trigémino y en el núcleo intertrigeminal. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo oral del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral ipsilateral y en los tres cuartos caudales del núcleo oral contralateral. Sin embargo, la mayor parte de la expresión de c-fos se observó en la mitad caudal del núcleo oral (74,4 % a nivel ipsilateral; 92,3% a nivel contralateral) (Tabla 61). Las neuronas c-fos positivas fueron más numerosas en la división ventral que en la división dorsal del núcleo oral ipsilateral, registrándose lo contrario en el núcleo oral contralateral. La expresión de c-fos fue significativamente mayor en el núcleo oral ventral ipsilateral que en el contralateral en todos los niveles, mientras que en el núcleo

Nivel	NÚCLEO ORAL			
	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	5	1,2	0	0
Segundo	16	4	0	0
Tercero	29	7,1	2	5,1
Cuarto	54	13,3	1	2,6
Quinto	61	15,1	7	17,9
Sexto	74	18,3	12	30,8
Séptimo	110	27,2	11	28,2
Octavo	56	13,8	6	15,4
TOTAL	405±129	100	39±9,4	100

Tabla 61. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

oral dorsal no se hallaron diferencias estadísticas entre ambos lados (Tabla 62). Los dibujos de cámara clara (Figs. 15B-E) muestran que las neuronas del núcleo oral ventral

que respondieron a la inyección de aceite de mostaza tras la administración de faclofeno se situaron de manera anárquica en toda la extensión del núcleo, mientras que en el núcleo oral dorsal las neuronas tendían a localizarse en la región más dorsal del mismo, próximas al núcleo del fascículo solitario.

Nivel	NÚCLEO ORAL DORSAL					NÚCLEO ORAL VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	1	100	0	0	0,092	4	100	0	0	0,002
Segundo	2	100	0	0	0,069	14	100	0	0	0,032
Tercero	13	86,7	2	13,3	0,092	16	100	0	0	0,044
Cuarto	29	96,7	1	3,3	0,092	25	100	0	0	0,008
Quinto	37	84,1	7	15,9	0,092	24	100	0	0	0,004
Sexto	13	54,2	11	45,8	0,117	61	98,4	1	1,6	0,027
Séptimo	28	77,8	8	22,2	0,092	82	96,5	3	3,5	0,007
Octavo	13	81,2	3	18,8	0,092	43	93,5	3	6,5	0,012
TOTAL	136±58,4	81	32±8,9	19	0,092	269±71,1	97,5	7±0,6	2,5	0,013

Tabla 62. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo interpolador del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolador. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo (55,7% a nivel ipsilateral; 53,3% a nivel contralateral) (Tabla 63). La expresión de c-fos fue mayor en la división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolador, especialmente a nivel ipsilateral. La

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR			
	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	27	5,9	10	5,5
Segundo	42	9,2	23	12,6
Tercero	68	14,9	24	13,2
Cuarto	65	14,3	28	15,4
Quinto	108	23,8	42	23,1
Sexto	145	31,9	55	30,2
TOTAL	455±139,2	100	182±61,5	100

Tabla 63. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

inmunorreactividad de c-fos fue significativamente más manifiesta en el tercio caudal del núcleo interpolares ventral ipsilateral que del contralateral; mientras que en el núcleo interpolares dorsal la diferencia entre ambos lados únicamente fue estadística en el sexto nivel (Tabla 64). Los dibujos de cámara clara (Figs. 15F-H) muestran que las neuronas c-fos positivas del núcleo interpolares ventral se situaron fundamentalmente en la región ventrolateral y ventromedial del núcleo interpolares; mientras que las del núcleo interpolares dorsal adoptaron una posición dorsolateral en el polo rostral y dorsomedial en el polo caudal del núcleo interpolares.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	8	88,9	1	11,1	0,099	19	67,9	9	32,1	0,134
Segundo	8	66,7	4	33,3	0,092	34	64,2	19	35,8	0,092
Tercero	11	78,6	3	21,4	0,092	57	73,1	21	26,9	0,072
Cuarto	8	61,5	5	38,5	0,371	57	71,2	23	28,8	0,117
Quinto	12	80	3	20	0,139	96	71,1	39	28,9	0,007
Sexto	14	77,8	4	22,2	0,031	131	72	51	28	<0,001
TOTAL	61±10,3	75,3	20±6,1	24,7	0,043	394±141	70,9	162±61	29,1	0,004

Tabla 64. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1) (Figs. 15I-L). Dicha inmunorreactividad de fue más manifiesta en el lado ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias significativas entre ambos lados en las 5 láminas dorsales (Tabla 65). Al analizar la distribución dorsoventral de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 74,4% de las neuronas ipsilaterales y el 75,3% de las contralaterales (Tabla 65). Las neuronas c-fos positivas en los dos tercios rostrales del núcleo caudal se situaron fundamentalmente en la zona ventral de las láminas I y II, mientras que en el tercio final del núcleo caudal y en C1 se localizaron en la zona media de dichas láminas (Figs. 11C y 15I-L).

NÚCLEO CAUDAL Y C1							
Láminas	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	p
I y II	1997	74,4	88,8	252	75,3	11,2	<0,001
III	313	11,7	89,7	36	10,7	10,3	0,004
IV	85	3,2	89,5	10	3	10,5	<0,001
V	288	10,7	88,6	37	11	11,4	<0,001
TOTAL	2683±471,4	100	88,9	335±122	100	11,1	<0,001

Tabla 65. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente tanto al núcleo oral (Tabla 66) como al núcleo interpolar (Tabla 67) del trigémino. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se concentraron en el tercio caudal de la formación reticular adyacente al núcleo oral (60,6% en el lado ipsilateral; 68,4% en el lado contralateral) (Tabla 66) y en la mitad caudal de la formación reticular adyacente al núcleo interpolar (61,7% en el lado ipsilateral; 60,4% en el lado contralateral) (Tabla 67). Tanto a la altura del núcleo

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	18	7,9	90	2	5,3	10	0,006
Segundo	12	5,3	92,3	1	2,6	7,7	<0,001
Tercero	22	9,6	88	3	7,9	12	0,001
Cuarto	22	9,6	91,7	2	5,3	8,3	<0,001
Quinto	16	7	80	4	10,5	20	0,016
Sexto	26	11,4	83,9	5	13,2	16,1	0,005
Séptimo	34	14,9	77,3	10	26,3	22,7	<0,001
Octavo	78	34,3	87,6	11	28,9	12,4	0,018
TOTAL	228±79,5	100	85,7	38±7,1	100	14,3	0,004

Tabla 66. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

oral como del núcleo interpolar, el número de neuronas con expresión de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, siendo las diferencias entre ambos lados significativas en todos los niveles a excepción del primer nivel de la formación

reticular adyacente al núcleo interpolador (Tablas 66 y 67). En los dibujos de cámara clara (Figs. 15B-H) se observa que las neuronas de la formación reticular ventral que fueron activadas por el aceite de mostaza cuando previamente se administró faclofeno, adoptaron la misma localización que la descrita tras la inyección de aceite de mostaza sin emplear ningún fármaco del sistema GABA_B.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	65	7,8	65	35	11,2	35	0,065
Segundo	105	12,8	70,9	43	13,7	29,1	0,045
Tercero	145	17,7	75,9	46	14,7	24,1	0,001
Cuarto	169	20,6	82,4	36	11,5	17,6	0,004
Quinto	174	21,2	74,4	60	19,2	25,6	0,01
Sexto	163	19,9	63,7	93	29,7	36,3	0,013
TOTAL	821±242,2	100	72,4	313±123,4	100	27,6	0,002

Tabla 67. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

El aceite de mostaza inyectado tras el pretratamiento con faclofeno, en general, sólo indujo inmunorreactividad de c-fos en la mitad caudal del núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral y en el tercio caudal del núcleo paratrigeminal rostral contralateral (Tabla 68). El número de neuronas c-fos positivas fue mayor en el lado ipsilateral que

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	1	2,1	100	0	0	0	0,092
Tercero	0	0	0	0	0	0	ND
Cuarto	1	2,1	100	0	0	0	0,058
Quinto	4	8,3	100	0	0	0	0,092
Sexto	10	20,8	90,9	1	50	9,1	0,022
Séptimo	19	39,6	95	1	50	5	0,016
Octavo	13	27,1	100	0	0	0	0,003
TOTAL	48±9,9	100	96	2±0,1	100	4	<0,001

Tabla 68. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados en el tercio caudal del núcleo (Tabla 68). Los dibujos de cámara clara (Fig. 15E) revelan que las neuronas que fueron activadas tras la inyección de este irritante químico se localizaron principalmente en la región más medial del núcleo paratrigeminal rostral, en estrecha proximidad con el núcleo oral.

La expresión de c-fos fue patente de manera bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se situaron en el tercio caudal del núcleo (74,5% a nivel ipsilateral; 65% a nivel contralateral) (Tabla 69). Al igual que se comentó en el párrafo precedente, el número de neuronas que presentaron inmunorreactividad de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, siendo las diferencias significativas entre ambos lados en los dos tercios caudales del núcleo (Tabla 69). Los dibujos de cámara clara (Figs. 15F-H) revelan que en el tercio rostral del núcleo paratrigeminal, las neuronas que fueron activadas tras la inyección de este irritante químico se localizaron principalmente en la región más medial de dicho núcleo, mientras que en los dos tercios caudales adoptaron una distribución uniforme en toda la extensión del núcleo.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	8	2	44,4	10	5,6	55,6	0,092
Segundo	7	1,7	50	7	4	50	0,901
Tercero	39	9,6	76,5	12	6,8	23,5	0,002
Cuarto	50	12,3	60,2	33	18,6	39,8	0,001
Quinto	137	33,6	67,2	67	37,9	32,8	0,002
Sexto	167	40,9	77,7	48	27,1	22,3	<0,001
TOTAL	408±131	100	69,7	177±52,8	100	30,3	<0,001

Tabla 69. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo paratrigeminal dorsal

El aceite de mostaza inyectado después de la administración intraperitoneal de faclofeno indujo expresión de c-fos bilateral en casi toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal dorsal. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en la mitad caudal del núcleo (69,9% a nivel ipsilateral; 82,8% a nivel contralateral) (Tabla 70). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias

estadísticas entre ambos lados únicamente en el segundo, tercero y cuarto nivel (Tabla 70). En los dibujos de cámara clara (Figs. 15F-H) se observa una distribución uniforme, en sentido dorsoventral y lateromedial, de la expresión de c-fos a nivel del núcleo paratrigeminal dorsal como consecuencia de la inyección de aceite de mostaza tras la administración de faclofeno.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	3	4,1	60	2	6,9	40	0,092
Segundo	6	8,2	66,7	3	10,3	33,3	0,005
Tercero	13	17,8	100	0	0	0	0,002
Cuarto	24	32,9	75	8	27,6	25	0,03
Quinto	20	27,4	66,7	10	34,5	33,3	0,05
Sexto	7	9,6	53,8	6	20,7	46,2	0,711
TOTAL	73±9,6	100	71,6	29±3,2	100	28,4	0,006

Tabla 70. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Complejo parabraquial

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de faclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. Al analizar la distribución lateromedial de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo parabraquial lateral (Figs. 8A-B), localizándose a este nivel el 64,8% de las neuronas ipsilaterales y el 70% de las neuronas contralaterales (Tabla 71). El número de neuronas c-fos positivas fue similar

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	610	64,8	51	587	70	49	0,678
Kölliker-Fuse	156	16,6	52,2	143	17,1	47,8	0,208
Parabraquial medial	175	18,6	61,8	108	12,9	38,2	0,012
TOTAL	941±255,1	100	52,9	838±227,4	100	47,1	0,238

Tabla 71. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de faclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

en ambos lados, hallándose únicamente diferencias significativas entre el lado ipsilateral y el contralateral en el núcleo parabraquial medial (Tabla 71). La inmunorreactividad de

c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión rostrocaudal del núcleo de Kölliker-Fuse, en la mitad caudal del núcleo parabraquial lateral y en la mitad rostral del núcleo parabraquial medial. Sin embargo, en la mitad rostral del núcleo parabraquial lateral y en la mitad caudal del núcleo parabraquial medial la expresión de c-fos se localizó fundamentalmente en la región medial de dichos núcleos.

4.3.6. Aceite de mostaza conjuntamente con agonistas del sistema GABA_B

El aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno indujo los mismos signos de inflamación local así como las reacciones nociceptivas observadas después de la inyección de aceite de mostaza sin emplear ningún fármaco del sistema GABA_B. Igualmente, tras la administración de baclofeno se observó expresión de c-fos en los núcleos oral, interpolar y caudal del trigémino, en la formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino, en los núcleos paratrigeminales, en el asta dorsal del primer segmento cervical y en el complejo parabraquial (Figs. 16A-I). La expresión de c-fos en el núcleo oral dorsal, en el núcleo interpolar dorsal y en el complejo parabraquial no presentó diferencias significativas entre ambos lados. Por el contrario, el número de neuronas c-fos positivas en el resto de las estructuras fue estadísticamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral.

Núcleo principal del trigémino

La estimulación con aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno no indujo ninguna expresión de c-fos en el núcleo principal del trigémino.

Núcleo oral del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo expresión de c-fos, casi de manera exclusiva, en el tercio caudal del núcleo oral ipsilateral (89,2% de las neuronas), no detectándose ninguna o escasa inmunorreactividad de c-fos en los dos tercios rostrales del núcleo oral ipsilateral y en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral contralateral (Tabla 72). Las neuronas c-fos positivas se localizaron principalmente en el núcleo oral ventral, observándose en dicha división diferencias estadísticas entre ambos lados únicamente en la mitad caudal

del núcleo (Tabla 73). Las neuronas del núcleo oral ventral que respondieron a la inyección de aceite de mostaza tras la administración de baclofeno se situaron únicamente en su mitad caudal, concretamente en los bordes medial y lateral, inmediatamente adyacentes a la formación reticular y al tracto trigeminal espinal, respectivamente (Figs. 9E y 16A-B).

NÚCLEO ORAL				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	0	0	0	0
Segundo	1	1,8	0	0
Tercero	2	3,6	0	0
Cuarto	0	0	0	0
Quinto	3	5,4	0	0
Sexto	12	21,4	0	0
Séptimo	27	48,2	2	100
Octavo	11	19,6	0	0
TOTAL	56±7,9	100	2±0,3	100

Tabla 72. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Nivel	NÚCLEO ORAL DORSAL					NÚCLEO ORAL VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	ND
Segundo	0	0	0	0	ND	1	100	0	0	0,058
Tercero	1	100	0	0	0,058	1	100	0	0	0,058
Cuarto	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	ND
Quinto	0	0	0	0	ND	3	100	0	0	0,035
Sexto	2	100	0	0	0,069	10	100	0	0	0,016
Séptimo	1	50	1	50	ND	26	96,3	1	3,7	0,001
Octavo	0	0	0	0	ND	11	100	0	0	0,021
TOTAL	4±0,2	80	1±0,1	20	0,063	52±9,8	98,1	1±0,2	1,9	<0,001

Tabla 73. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo interpolar del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron en el tercio caudal del núcleo (66,7% a nivel ipsilateral; 44,5% a nivel contralateral) (Tabla 74). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en la

división ventral que en la división dorsal del núcleo interpolar, especialmente a nivel ipsilateral. La expresión de c-fos fue estadísticamente mayor en el núcleo interpolar ventral ipsilateral que en el contralateral en el cuarto y sexto nivel; mientras que en el núcleo interpolar dorsal ipsilateral el número de neuronas c-fos positivas fue significativamente menor que en el lado contralateral únicamente en el segundo nivel (Tabla 75). La inmunorreactividad de c-fos del núcleo interpolar ventral únicamente se localizó en su borde medial, adyacente a la formación reticular (Figs. 10C y 16C-E).

NÚCLEO INTERPOLAR				
Nivel	IL		CL	
	X±SEM	% _{R-C}	X±SEM	% _{R-C}
Primero	2	3,2	2	5,5
Segundo	4	6,3	8	22,2
Tercero	6	9,5	5	13,9
Cuarto	9	14,3	5	13,9
Quinto	13	20,6	11	30,6
Sexto	29	46,1	5	13,9
TOTAL	63±7,2	100	36±8,2	100

Tabla 74. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Nivel	NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL					NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL				
	IL		CL		IL vs CL	IL		CL		IL vs CL
	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p	X±SEM	% _{IL}	X±SEM	% _{CL}	p
Primero	1	50	1	50	0,391	1	50	1	50	ND
Segundo	0	0	2	100	0,006	4	40	6	60	0,308
Tercero	0	0	0	0	ND	6	54,5	5	45,5	0,658
Cuarto	2	66,7	1	33,3	0,474	7	63,6	4	36,4	0,005
Quinto	1	100	0	0	0,092	12	52,2	11	47,8	0,092
Sexto	0	0	0	0	ND	29	85,3	5	14,7	<0,001
TOTAL	4±0,3	50	4±0,2	50	0,05	59±8,2	64,8	32±7,3	35,2	0,001

Tabla 75. Neuronas ipsilaterales y contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

Núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudal del trigémino e ipsilateralmente en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1) (Figs. 16F-I). A pesar de que la inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en el lado ipsilateral que en el contralateral, únicamente se

hallaron diferencias estadísticas entre ambos lados en las láminas I-II y V (Tabla 76). Al analizar la distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas se constató que éstas eran más numerosas en las dos láminas más superficiales, situándose a este nivel el 85,6% de las neuronas ipsilaterales y el 69,7% de las neuronas contralaterales (Tabla 76). Las neuronas del núcleo caudal que respondieron a la inyección de aceite de mostaza tras la administración de baclofeno se situaron casi de manera exclusiva en las láminas más superficiales de Rexed (Figs. 11D y 16F-I).

NÚCLEO CAUDAL Y C1							
Láminas	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{D-V}	% _{IL}	X±SEM	% _{D-V}	% _{CL}	
I y II	1009	85,6	82,6	212	69,7	17,4	0,025
III	69	5,9	83,1	14	4,6	16,9	0,052
IV	41	3,4	52,6	37	12,2	47,4	0,534
V	60	5,1	59,4	41	13,5	40,6	<0,001
TOTAL	1179±381	100	79,5	304±128,4	100	20,5	0,01

Tabla 76. Distribución dorsoventral de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Formación reticular ventral adyacente a los núcleos oral e interpolar del trigémino

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en casi toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente tanto al núcleo oral (Tabla 77) como al núcleo interpolar (Tabla 78) del trigémino. La expresión de c-fos fue bastante uniforme a lo largo de la extensión rostrocaudal de la formación reticular, aunque se ha observado un ligero aumento de las neuronas c-fos positivas en el tercio caudal de la formación reticular ipsilateral adyacente al núcleo oral (56,4% de las neuronas), en los tercios rostral (42,8% de las neuronas) y caudal (39,3% de las neuronas) de la formación reticular contralateral adyacente al núcleo oral (Tabla 77) y en el tercio caudal de la formación reticular ipsilateral (43,6% de las neuronas) y contralateral (40,3% de las neuronas) adyacente al núcleo interpolar (Tabla 78). Tanto a la altura del núcleo oral como del interpolar, la inmunorreactividad de c-fos fue mayor en la formación reticular ipsilateral que en la contralateral, sin embargo, sólo se hallaron diferencias significativas entre ambos lados en el segundo, sexto, séptimo y octavo nivel de la formación reticular adyacente al núcleo oral (Tabla 77) y en el primer, cuarto y quinto nivel de la formación reticular adyacente al núcleo interpolar (Tabla 78). Las neuronas

de la formación reticular ventral que fueron activadas por el aceite de mostaza cuando previamente se administró baclofeno, adoptaron la misma localización que la descrita tras la inyección de aceite de mostaza sin emplear ningún fármaco del sistema GABA_B (Figs. 10C y 16B-E).

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	4	5,5	100	0	0	0	0,08
Segundo	6	8,5	75	2	7,1	25	0,047
Tercero	10	14,1	50	10	35,7	50	1
Cuarto	8	11,3	66,7	4	14,3	33,3	0,08
Quinto	3	4,2	75	1	3,6	25	0,117
Sexto	13	18,3	92,9	1	3,6	7,1	<0,001
Séptimo	8	11,3	66,7	4	14,3	33,3	<0,001
Octavo	19	26,8	76	6	21,4	24	0,001
TOTAL	71±18,3	100	71,7	28±7,4	100	28,3	0,001

Tabla 77. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	37	12,4	52,9	33	15,3	47,1	0,016
Segundo	30	10,1	44,8	37	17,1	55,2	0,217
Tercero	44	14,8	64,7	24	11,1	35,3	0,055
Cuarto	57	19,1	62	35	16,2	38	0,013
Quinto	74	24,8	70,5	31	14,4	29,5	0,008
Sexto	56	18,8	50	56	25,9	50	1
TOTAL	298±112,4	100	58	216±81,2	100	42	<0,001

Tabla 78. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleos paratrigeminales rostral y ventral

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno únicamente indujo inmunorreactividad de c-fos en los dos tercios caudales del núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral y en el cuarto caudal del núcleo paratrigeminal rostral contralateral (Tabla 79). El número de neuronas c-fos positivas fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, hallándose diferencias estadísticas entre ambos lados en el tercio caudal del núcleo (Tabla 79).

Por el contrario, la expresión de c-fos se registró bilateralmente en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal ventral. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se situaron en la mitad caudal del núcleo (89% a nivel ipsilateral; 80,5% a nivel contralateral) (Tabla 80). El número de neuronas que presentaron inmunorreactividad de c-fos fue mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, siendo las diferencias significativas entre ambos lados en los dos cuartos caudales del núcleo (Tabla 80). Las neuronas que fueron activadas por el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno se localizaron principalmente en la región más medial de los núcleos paratrigeminales rostral y ventral, en estrecha proximidad con el núcleo oral e interpolar del trigémino (Figs. 10C-D y 16A-E).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	0	0	0	0	0	0	ND
Segundo	0	0	0	0	0	0	ND
Tercero	0	0	0	0	0	0	ND
Cuarto	2	2,9	100	0	0	0	0,069
Quinto	4	5,8	100	0	0	0	0,08
Sexto	23	33,3	100	0	0	0	<0,001
Séptimo	23	33,3	85,2	4	100	14,8	0,003
Octavo	17	24,7	100	0	0	0	0,03
TOTAL	69±9,3	100	94,5	4±0,5	100	5,5	0,001

Tabla 79. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral; ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	5	1,9	62,5	3	2,8	37,5	0,092
Segundo	4	1,5	40	6	5,6	60	0,092
Tercero	20	7,6	62,5	12	11,1	37,5	<0,001
Cuarto	40	15,3	64,5	22	20,3	35,5	0,012
Quinto	107	40,9	73,8	38	35,2	26,2	0,005
Sexto	86	32,8	76,1	27	25	23,9	<0,001
TOTAL	262±91,4	100	70,8	108±23,5	100	29,2	<0,001

Tabla 80. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Núcleo paratrigeminal dorsal

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo expresión de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del núcleo paratrigeminal dorsal. Sin embargo, la mayor parte de las neuronas c-fos positivas se registraron ipsilateralmente en el tercio caudal (69,4% de las neuronas) y contralateralmente en la mitad caudal (56,3% de las neuronas) del núcleo (Tabla 81). La inmunorreactividad de c-fos fue más manifiesta en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral que en el contralateral, a pesar de que sólo se hallaron diferencias estadísticas entre ambos lados en el quinto nivel (Tabla 81). En los dibujos de cámara clara (Figs. 16C-E) se observa que la expresión de c-fos fue vista generalmente en la región más dorsal del núcleo paratrigeminal dorsal, adoptando una posición medial en el polo rostral y una localización lateral en el polo caudal del núcleo.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL							
Nivel	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{R-C}	% _{IL}	X±SEM	% _{R-C}	% _{CL}	p
Primero	4	11,1	66,7	2	12,5	33,3	0,092
Segundo	1	2,8	33,3	2	12,5	66,7	0,092
Tercero	5	13,9	62,5	3	18,7	37,5	0,308
Cuarto	1	2,8	20	4	25	80	0,092
Quinto	18	50	81,8	4	25	18,2	0,049
Sexto	7	19,4	87,5	1	6,3	12,5	0,052
TOTAL	36±8,2	100	69,2	16±2,7	100	30,8	0,001

Tabla 81. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

Complejo parabraquial

El aceite de mostaza inyectado tras la administración intraperitoneal de baclofeno indujo inmunorreactividad de c-fos bilateral en toda la extensión rostrocaudal del complejo parabraquial. Al analizar la distribución lateromedial de la expresión de c-fos se constató que ésta era mayor en el núcleo parabraquial lateral, localizándose a este nivel el 69,2% de las neuronas ipsilaterales y el 68,8% de las neuronas contralaterales (Tabla 82). El número de neuronas c-fos positivas fue similar en ambos lados, hallándose únicamente diferencias significativas entre el lado ipsilateral y el contralateral en el núcleo parabraquial medial (Tabla 82). La inmunorreactividad de c-fos se distribuyó uniformemente en sentido dorsoventral y lateromedial en toda la extensión rostrocaudal del núcleo parabraquial lateral y del núcleo de Kölliker-Fuse. Por

el contrario, en el núcleo parabraquial medial la expresión de c-fos se observó fundamentalmente en la región medial de la mitad rostral de dicho núcleo, no existiendo ninguna o escasa expresión de c-fos en la mitad caudal del mismo.

COMPLEJO PARABRAQUIAL							
Núcleo	IL			CL			IL vs CL
	X±SEM	% _{L-M}	% _{IL}	X±SEM	% _{L-M}	% _{CL}	p
Parabraquial lateral	318	69,2	49,1	330	68,8	50,9	0,308
Kölliker-Fuse	54	11,7	41,9	75	15,6	58,1	0,308
Parabraquial medial	88	19,1	54	75	15,6	46	0,042
TOTAL	460±129	100	48,9	480±124,2	100	51,1	0,456

Tabla 82. Distribución lateromedial de las neuronas c-fos positivas. Están representadas el número y el porcentaje de neuronas ipsilaterales y contralaterales activadas por el aceite de mostaza tras la administración de baclofeno. IL: ipsilateral; CL: contralateral.

4.4. Diferencias en la expresión de c-fos entre los distintos grupos experimentales

La capacidad del aceite de mostaza, la formalina y la capsaicina para inducir c-fos con respecto a las sustancias empleadas como control son representadas en las Tablas 83-114. Igualmente, se muestran las diferencias halladas en la expresión de c-fos entre estos tres irritantes químicos, describiéndose además como afectan los agonistas y antagonistas del sistema GABA_B a la inmunorreactividad de c-fos inducida por el aceite de mostaza.

4.4.1. Ipsilateral

a) Núcleo oral del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo oral

▪ Diferencias con los grupos control

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 1-3)

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral y en la formación reticular ventral adyacente al mismo fue significativamente mayor en el grupo de animales estimulado con aceite de mostaza que en el grupo que únicamente fue anestesiado o estimulado con aceite mineral (Tablas 83-85). Los cobayas estimulados con el aceite de mostaza presentaron un aumento significativo de la expresión de c-fos, en comparación con el grupo de cobayas a los que se les inyectó aceite mineral o el grupo que únicamente fue anestesiado, en el núcleo oral ventral (tercero, sexto, séptimo y octavo nivel) (Tabla 83) y dorsal (sexto y séptimo nivel) (Tabla 84) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (primero, segundo, cuarto, sexto) (Tabla 85).

Capsaicina versus control con solución salina y anestesia (Hists. 4-6)

La inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral ventral (Tabla 86) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (sexto y octavo nivel) (Tabla 87) fue estadísticamente mayor tras la inyección de capsaicina que después de la administración de anestesia o la estimulación con solución salina. Igualmente, la activación neuronal registrada tras la inyección de capsaicina fue significativamente mayor en comparación al grupo control con anestesia en el cuarto, quinto y sexto nivel del núcleo oral dorsal (Tabla 88) y en el cuarto y séptimo nivel de

la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 87). Por el contrario, la solución salina indujo estadísticamente más expresión de c-fos que la capsaicina en toda la extensión rostrocaudal del núcleo oral dorsal (Tabla 88) y en el segundo nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 87).

Formalina versus control con anestesia (Hists. 4-6)

Los animales estimulados con formalina registraron valores significativamente mayores de inmunorreactividad de c-fos en comparación al grupo que únicamente fue anestesiado en las divisiones ventral (todos los niveles a excepción del octavo) (Tabla 86) y dorsal (cuarto, quinto, sexto y octavo nivel) (Tabla 88) del núcleo oral y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (cuarto, sexto, séptimo y octavo nivel) (Tabla 87).

▪ **Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos (Hists. 4-6)**

La expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza sólo fue estadísticamente mayor que la asociada a la capsaicina en el núcleo oral dorsal (Tabla 88), y que la debida a la formalina en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 87). La expresión de c-fos asociada al aceite de mostaza fue estadísticamente mayor que la registrada tras la inyección de capsaicina o formalina en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (primero, segundo y cuarto nivel) (Tabla 87). Además, se observó un mayor grado de activación neuronal después de la administración de aceite de mostaza, en comparación a la capsaicina, en el núcleo oral ventral (séptimo nivel) (Tabla 86) y dorsal (sexto y séptimo nivel) (Tabla 88) y, en comparación a la formalina, en el núcleo oral ventral (sexto y octavo nivel) (Tabla 86).

La capsaicina indujo significativamente más inmunorreactividad de c-fos que la formalina en el núcleo oral ventral (tercero, cuarto, quinto y sexto nivel) (Tabla 86), observándose el efecto contrario en el quinto nivel del núcleo oral dorsal (Tabla 88). En la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral no se registraron diferencias estadísticas entre el número de neuronas c-fos positivas inducidas por la capsaicina y por la formalina (Tabla 87).

▪ **Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 1-3)**

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral y en la formación reticular ventral adyacente al mismo fue significativamente menor tras la administración sistémica de baclofeno. Por el contrario, el faclofeno no indujo diferencias estadísticas (Tablas 83-85).

El aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno indujo una disminución estadística de la expresión de c-fos, en comparación con los cobayas a los que únicamente se les inyectó aceite de mostaza, en el núcleo oral ventral (todos los niveles a excepción del primero y quinto) (Tabla 83) y dorsal (cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo nivel) (Tabla 84) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (segundo, cuarto y quinto nivel) (Tabla 85).

Por el contrario, tras la administración de faclofeno se observó un aumento significativo de las neuronas c-fos positivas únicamente en el primer nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral, registrándose el efecto contrario en el segundo y cuarto nivel (Tabla 85). En el núcleo oral, no se hallaron diferencias estadísticas entre la inmunorreactividad de c-fos inducida por el aceite de mostaza y aquella asociada al aceite de mostaza tras el pretratamiento con el antagonista del sistema GABA_B (Tablas 83 y 84).

La activación neuronal en el núcleo oral ventral (todos los niveles) (Tabla 83) y dorsal (segundo, cuarto, quinto y octavo nivel) (Tabla 84) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (todos los niveles) (Tabla 85) tras la administración de faclofeno fue significativamente mayor que la registrada después del pretratamiento con baclofeno.

NÚCLEO ORAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	4	0,081	1	0,081	0,081
	AMB	0	---	<0,001	ND	ND
	AMF	4	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	9	0,041	0,336	0,056	0,056
	AMB	1	---	0,012	0,02	0,02
	AMF	14	---	---	0,023	0,023
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	16	0,015	1	0,029	0,029
	AMB	1	---	0,019	0,02	0,02
	AMF	16	---	---	0,035	0,035
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	26	0,026	0,921	0,055	0,055
	AMB	0	---	0,001	ND	ND
	AMF	25	---	---	0,003	0,003
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	33	0,054	0,511	0,076	0,076
	AMB	3	---	0,001	0,027	0,027
	AMF	24	---	---	0,001	0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	60	<0,001	0,949	<0,001	<0,001
	AMB	10	---	0,013	0,009	0,009
	AMF	61	---	---	0,016	0,016
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	87	0,016	0,823	0,01	0,01
	AMB	26	---	0,003	<0,001	<0,001
	AMF	82	---	---	0,002	0,002
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	59	0,022	0,377	0,024	0,024
	AMB	11	---	0,003	0,013	0,013
	AMF	43	---	---	0,002	0,002
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	294±122	0,007	0,743	0,002	0,002

Tabla 83. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO ORAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	1	0,128	1	0,138	0,138
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	1	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	6	0,174	0,35	0,25	0,25
	AMB	0	---	0,019	ND	ND
	AMF	2	---	---	0,043	0,043
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	7	0,129	0,378	0,142	0,142
	AMB	1	---	0,065	0,02	0,02
	AMF	13	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	6	0,029	0,1	0,06	0,06
	AMB	0	---	0,047	ND	ND
	AMF	29	---	---	0,089	0,089
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	6	0,032	0,085	0,066	0,066
	AMB	0	---	0,048	ND	ND
	AMF	37	---	---	0,09	0,09
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	15	0,011	0,764	0,016	0,016
	AMB	2	---	0,085	0,043	0,043
	AMF	13	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	9	<0,001	0,148	<0,001	<0,001
	AMB	1	---	0,056	0,093	0,093
	AMF	28	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	5	0,026	0,188	0,056	0,056
	AMB	0	---	0,044	ND	ND
	AMF	13	---	---	0,084	0,084
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	55±4,3	0,01	0,2	0,004	0,004

Tabla 84. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	9	0,138	0,022	0,046	0,031
	AMB	4	---	<0,001	0,142	0,065
	AMF	18	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	32	0,01	0,03	0,012	0,012
	AMB	6	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	12	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	27	0,223	0,696	0,127	0,116
	AMB	10	---	0,027	0,081	0,059
	AMF	22	---	---	0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	71	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	AMB	8	---	0,004	0,112	0,079
	AMF	22	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	42	0,039	0,133	0,061	0,061
	AMB	3	---	0,003	0,093	0,093
	AMF	16	---	---	0,003	0,003
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	40	0,058	0,28	0,032	0,032
	AMB	13	---	0,003	<0,001	<0,001
	AMF	26	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	53	0,066	0,382	0,079	0,075
	AMB	8	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	34	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	130	0,052	0,314	0,066	0,063
	AMB	19	---	0,002	<0,001	<0,001
	AMF	78	---	---	0,003	0,003
	Am	3	---	---	---	0,026
	An	1	---	---	---	---
Total	AM	404±119,5	0,014	0,125	<0,001	<0,001

Tabla 85. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO ORAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	P			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	4	0,07	0,058	0,081	0,081
	CAP	10	---	1	0,013	0,013
	FOR	10	---	---	0,009	0,009
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	9	0,157	0,463	0,056	0,056
	CAP	16	---	0,578	0,007	0,007
	FOR	13	---	---	0,043	0,043
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	16	0,529	0,15	0,029	0,029
	CAP	13	---	0,036	<0,001	<0,001
	FOR	8	---	---	0,014	0,014
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	26	0,459	0,265	0,089	0,055
	CAP	19	---	0,034	<0,001	<0,001
	FOR	15	---	---	0,001	<0,001
	SAL	4	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	33	0,551	0,207	0,076	0,076
	CAP	25	---	0,014	<0,001	<0,001
	FOR	15	---	---	0,002	0,002
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	60	0,212	<0,001	<0,001	<0,001
	CAP	49	---	0,032	0,002	0,002
	FOR	30	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	87	0,037	0,05	0,012	0,01
	CAP	38	---	0,05	<0,001	<0,001
	FOR	42	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	4	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	59	0,051	0,041	0,024	0,024
	CAP	20	---	0,59	0,009	0,009
	FOR	16	---	---	0,064	0,064
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	294±122	0,128	0,056	0,087	0,002

Tabla 86. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	9	0,012	0,012	0,031	0,031
	CAP	0	---	ND	ND	ND
	FOR	0	---	---	ND	ND
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	32	0,007	0,004	0,046	0,012
	CAP	3	---	0,05	0,005	0,093
	FOR	0	---	---	<0,001	ND
	SAL	10	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	27	0,568	0,735	0,474	0,116
	CAP	38	---	0,343	0,232	0,066
	FOR	22	---	---	0,521	0,053
	SAL	16	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	71	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	CAP	20	---	0,243	0,616	0,044
	FOR	11	---	---	0,012	0,023
	SAL	24	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	42	0,059	0,082	0,109	0,061
	CAP	7	---	0,569	0,779	0,093
	FOR	10	---	---	0,696	0,093
	SAL	8	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	40	0,2	0,066	0,055	0,032
	CAP	22	---	0,172	0,04	0,013
	FOR	14	---	---	0,009	0,001
	SAL	6	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	53	0,481	0,603	0,222	0,075
	CAP	37	---	0,739	0,108	0,008
	FOR	41	---	---	0,099	0,011
	SAL	20	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	130	0,185	0,115	0,074	0,063
	CAP	58	---	0,43	0,032	0,02
	FOR	44	---	---	0,015	0,007
	SAL	8	---	---	---	<0,001
	An	1	---	---	---	---
Total	AM	404±119,5	0,092	0,043	0,045	0,004

Tabla 87. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO ORAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	1	0,128	0,128	0,138	0,138
	CAP	0	---	ND	0,001	ND
	FOR	0	---	---	0,001	ND
	SAL	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	6	0,249	0,174	0,048	0,25
	CAP	1	---	0,05	<0,001	0,093
	FOR	0	---	---	<0,001	ND
	SAL	18	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	7	0,13	0,085	0,041	0,142
	CAP	1	---	0,05	<0,001	0,093
	FOR	0	---	---	<0,001	ND
	SAL	18	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	6	0,656	0,48	0,168	0,06
	CAP	5	---	0,125	<0,001	<0,001
	FOR	8	---	---	0,348	0,009
	SAL	10	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	6	0,672	0,272	0,066	0,066
	CAP	5	---	0,027	<0,001	0,001
	FOR	9	---	---	0,093	0,002
	SAL	12	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	15	0,034	0,234	0,016	0,016
	CAP	5	---	0,236	<0,001	0,009
	FOR	9	---	---	0,002	0,045
	SAL	30	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	9	<0,001	0,246	<0,001	<0,001
	CAP	1	---	0,071	<0,001	0,093
	FOR	6	---	---	0,002	0,074
	SAL	22	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	5	0,062	0,149	0,196	0,056
	CAP	1	---	0,231	<0,001	0,093
	FOR	2	---	---	<0,001	0,043
	SAL	8	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	55±4,3	0,042	0,255	0,073	<0,001

Tabla 88. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

b) Núcleo interpolar del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar**▪ Diferencias con los grupos control***Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 7-9)*

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo interpolar y en la formación reticular ventral adyacente al mismo fue significativamente mayor en el grupo de animales estimulado con aceite de mostaza que en el grupo que únicamente fue anestesiado o estimulado con aceite mineral (Tablas 89-91). El aceite de mostaza indujo significativamente más expresión de c-fos que el aceite mineral o la anestesia en el núcleo interpolar ventral (todos los niveles menos el tercero) (Tabla 89) y dorsal (segundo y quinto nivel) (Tabla 90) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (primero, segundo, cuarto y quinto nivel) (Tabla 91).

Capsaicina versus control con solución salina y anestesia (Hists. 10-12)

La inyección de solución salina o la administración únicamente de anestesia indujeron estadísticamente menos inmunorreactividad de c-fos que la estimulación con capsaicina en el tercio rostral del núcleo interpolar ventral (Tabla 92), en el tercio medio del núcleo interpolar dorsal (Tabla 93) y en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 94). Además, la capsaicina también se asoció con niveles de expresión de c-fos significativamente más elevados que el grupo control con anestesia en los dos tercios caudales del núcleo interpolar ventral (Tabla 92) y en el sexto nivel del núcleo interpolar dorsal (Tabla 93). Por el contrario, el número de neuronas del cuarto nivel del núcleo interpolar ventral que respondieron a la inyección de solución salina fue estadísticamente mayor que el registrado tras la administración de capsaicina (Tabla 92).

Formalina versus control con anestesia (Hists. 10-12)

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo interpolar dorsal (sexto nivel) (Tabla 93) y en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar ventral (Tabla 92) y de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 94) fue significativamente mayor en los cobayas a los que se les inyectó formalina que en el grupo control con anestesia.

▪ **Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos (Hists. 10-12)**

La expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza sólo fue estadísticamente mayor que la asociada a la capsaicina en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 94), y que la debida a la formalina en el núcleo interpolar ventral (Tabla 92) y en la formación reticular ventral adyacente a dicho núcleo (Tabla 94). Los cobayas estimulados con el aceite de mostaza presentaron un número significativamente mayor de neuronas c-fos positivas que los estimulados con capsaicina o formalina en el núcleo interpolar ventral (quinto nivel) (Tabla 92) y dorsal (segundo nivel) (Tabla 93) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (segundo, cuarto y quinto nivel) (Tabla 94). Además, en el cuarto nivel del núcleo interpolar ventral (Tabla 92) y en el sexto nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 94) se registró un mayor grado de activación neuronal tras la inyección de aceite de mostaza que tras la aplicación de capsaicina; de la misma forma que la expresión de c-fos asociada al aceite de mostaza fue estadísticamente mayor que la inducida por la formalina en el segundo nivel del núcleo interpolar ventral (Tabla 92) y en el quinto nivel del núcleo interpolar dorsal (Tabla 93). Por el contrario, la formalina indujo significativamente más inmunorreactividad de c-fos que el aceite de mostaza en el tercer nivel del núcleo interpolar ventral (Tabla 92).

El número de neuronas del segundo nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 94) que respondieron a la estimulación con formalina fue estadísticamente mayor que el registrado tras la administración de capsaicina, al contrario de lo que se observó en el segundo nivel del núcleo interpolar ventral (Tabla 92).

▪ **Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 7-9)**

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo interpolar y en la formación reticular ventral adyacente al mismo fue significativamente menor tras la administración sistémica de baclofeno. Por el contrario, el baclofeno sólo indujo un aumento estadístico de la expresión de c-fos en el núcleo interpolar ventral (Tablas 89-91).

Los cobayas estimulados con aceite de mostaza tras la administración de baclofeno presentaron una disminución estadística en el número de neuronas c-fos positivas en comparación con el grupo donde sólo se aplicó el aceite de mostaza, en el núcleo interpolar ventral (primero, segundo, cuarto y quinto nivel) (Tabla 89) y dorsal

(segundo y quinto nivel) (Tabla 90) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (primero, segundo, cuarto y quinto nivel) (Tabla 91).

Por el contrario, en los animales estimulados tras el pretratamiento con faclofeno se observó un aumento significativo de la expresión de c-fos únicamente en el núcleo interpolar ventral (segundo, tercero y sexto nivel) (Tabla 89), pero no en el núcleo interpolar dorsal (Tabla 90) ni en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 91).

El número de neuronas con inmunorreactividad de c-fos tras la administración de faclofeno fue estadísticamente mayor que el registrado tras el pretratamiento con baclofeno en el núcleo interpolar ventral (todos los niveles a excepción del primero) (Tabla 89) y dorsal (sexto nivel) (Tabla 90) y en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 91).

NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	16	0,035	0,153	0,022	0,018
	AMB	1	---	0,06	0,02	0,02
	AMF	19	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	10	0,006	0,035	0,003	0,004
	AMB	4	---	0,014	0,02	0,043
	AMF	34	---	---	0,025	0,027
	Am	1	---	---	---	0,225
	An	2	---	---	---	---
Tercero	AM	10	0,316	0,039	0,124	0,064
	AMB	6	---	0,027	0,033	0,002
	AMF	57	---	---	0,046	0,041
	Am	2	---	---	---	0,225
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	22	<0,001	0,131	<0,001	<0,001
	AMB	7	---	0,047	0,02	0,005
	AMF	57	---	---	0,068	0,061
	Am	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	67	0,005	0,255	0,007	0,006
	AMB	12	---	0,005	0,049	0,027
	AMF	96	---	---	0,009	0,009
	Am	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	49	0,091	<0,001	0,009	0,01
	AMB	29	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	131	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	2	---	---	---	---
Total	AM	174±54,3	<0,001	0,022	<0,001	<0,001

Tabla 89. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	1	1	0,078	0,138	0,138
	AMB	1	---	0,078	0,093	0,093
	AMF	8	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	3	0,008	0,181	0,003	0,003
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	8	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	3	0,05	0,136	0,093	0,093
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	11	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	3	0,542	0,205	0,112	0,549
	AMB	2	---	0,125	0,093	1
	AMF	8	---	---	0,093	0,181
	Am	0	---	---	---	0,004
	An	2	---	---	---	---
Quinto	AM	8	0,009	0,472	0,013	0,013
	AMB	1	---	0,067	0,093	0,093
	AMF	12	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	5	0,168	0,133	0,242	0,242
	AMB	0	---	0,014	ND	ND
	AMF	14	---	---	0,034	0,034
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	23±4,7	0,012	0,162	0,03	0,047

Tabla 90. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	108	0,035	0,153	0,022	0,018
	AMB	37	---	0,023	0,014	0,007
	AMF	65	---	---	0,001	0,001
	Am	9	---	---	---	0,045
	An	4	---	---	---	---
Segundo	AM	117	0,015	0,721	0,015	0,013
	AMB	30	---	0,008	<0,001	<0,001
	AMF	105	---	---	0,007	0,006
	Am	5	---	---	---	0,001
	An	2	---	---	---	---
Tercero	AM	143	0,093	0,97	0,065	0,063
	AMB	44	---	<0,001	0,001	0,001
	AMF	145	---	---	<0,001	<0,001
	Am	5	---	---	---	0,158
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	135	0,025	0,323	0,009	0,009
	AMB	57	---	0,001	<0,001	<0,001
	AMF	169	---	---	0,001	0,001
	Am	5	---	---	---	0,158
	An	6	---	---	---	---
Quinto	AM	179	0,008	0,899	0,002	0,002
	AMB	74	---	0,014	0,001	0,002
	AMF	174	---	---	0,004	0,004
	Am	5	---	---	---	0,007
	An	8	---	---	---	---
Sexto	AM	101	0,192	0,117	0,088	0,057
	AMB	56	---	0,001	0,012	0,003
	AMF	163	---	---	0,001	0,001
	Am	26	---	---	---	<0,001
	An	14	---	---	---	---
Total	AM	783±216,5	0,035	0,862	0,008	0,005

Tabla 91. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	16	0,102	0,102	0,03	0,018
	CAP	12	---	0,26	0,002	0,002
	FOR	17	---	---	0,011	0,011
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	10	1	0,042	0,002	0,004
	CAP	10	---	0,013	<0,001	<0,001
	FOR	6	---	---	0,004	0,009
	SAL	1	---	---	---	0,04
	An	2	---	---	---	---
Tercero	AM	10	0,097	0,037	0,214	0,064
	CAP	19	---	0,59	0,416	0,002
	FOR	21	---	---	0,093	<0,001
	SAL	16	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	22	0,019	0,461	<0,001	<0,001
	CAP	17	---	0,271	<0,001	<0,001
	FOR	20	---	---	0,001	0,001
	SAL	41	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	67	0,043	0,015	0,05	0,006
	CAP	32	---	0,228	0,665	0,004
	FOR	24	---	---	0,119	<0,001
	SAL	29	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	49	0,687	0,376	0,746	0,01
	CAP	43	---	0,656	0,875	0,019
	FOR	37	---	---	0,423	0,012
	SAL	45	---	---	---	<0,001
	An	2	---	---	---	---
Total	AM	174±54,3	0,066	0,02	0,051	<0,001

Tabla 92. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	1	0,179	0,331	0,138	0,138
	CAP	3	---	0,522	0,093	0,093
	FOR	2	---	---	0,093	0,093
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	3	0,019	0,008	0,003	0,003
	CAP	1	---	0,05	0,093	0,093
	FOR	0	---	---	ND	ND
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	3	0,06	0,433	0,093	0,093
	CAP	7	---	0,433	0,005	0,005
	FOR	5	---	---	0,093	0,093
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	3	0,219	0,542	0,549	0,549
	CAP	5	---	0,369	0,01	0,01
	FOR	4	---	---	0,093	0,093
	SAL	2	---	---	---	ND
	An	2	---	---	---	---
Quinto	AM	8	0,051	0,022	0,036	0,013
	CAP	3	---	0,476	0,45	0,057
	FOR	2	---	---	1	0,093
	SAL	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	5	0,772	0,434	0,802	0,242
	CAP	6	---	0,315	0,093	0,002
	FOR	8	---	---	0,093	0,009
	SAL	4	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	23±4,7	0,732	0,72	0,058	0,047

Tabla 93. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	108	0,102	0,102	0,03	0,018
	CAP	59	---	1	<0,001	<0,001
	FOR	59	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	18	---	---	---	<0,001
	An	4	---	---	---	---
Segundo	AM	117	0,022	0,027	0,014	0,013
	CAP	38	---	0,008	<0,001	<0,001
	FOR	42	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	4	---	---	---	0,004
	An	2	---	---	---	---
Tercero	AM	143	0,13	0,114	0,068	0,063
	CAP	56	---	0,465	<0,001	<0,001
	FOR	51	---	---	0,001	0,001
	SAL	7	---	---	---	0,001
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	135	0,014	0,012	0,01	0,009
	CAP	41	---	0,794	0,026	0,017
	FOR	38	---	---	0,021	0,013
	SAL	10	---	---	---	<0,001
	An	6	---	---	---	---
Quinto	AM	179	0,002	0,004	0,003	0,002
	CAP	38	---	0,089	<0,001	<0,001
	FOR	56	---	---	0,006	0,006
	SAL	9	---	---	---	0,04
	An	8	---	---	---	---
Sexto	AM	101	0,08	0,545	0,071	0,057
	CAP	38	---	0,05	<0,001	<0,001
	FOR	79	---	---	0,031	0,022
	SAL	20	---	---	---	<0,001
	An	14	---	---	---	---
Total	AM	783±216,5	0,028	0,044	0,032	0,005

Tabla 94. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An).

c) Núcleo caudal del trigémino y primer segmento cervical**▪ Diferencias con los grupos control***Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hist. 13)*

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo caudal y en el tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1) fue significativamente mayor en el grupo de animales estimulado con aceite de mostaza que en el grupo que únicamente fue anestesiado o estimulado con aceite mineral. Los animales estimulados con aceite de mostaza presentaron un aumento significativo de las neuronas c-fos positivas en comparación con los cobayas a los que se les inyectó aceite mineral o a los que únicamente se les administró la anestesia en las 5 láminas superficiales del núcleo caudal y de C1 (Tabla 95).

Capsaicina versus control con solución salina y anestesia (Hist. 14)

La inmunorreactividad de c-fos inducida por la capsaicina en las láminas I-IV del núcleo caudal y tercio rostral del asta dorsal de C1 fue estadísticamente mayor que la asociada a la solución salina y a la anestesia. Además, la capsaicina activó significativamente más neuronas que la anestesia en la lámina V de Rexed (Tabla 96).

Formalina versus control con anestesia (Hist. 14)

El grupo control con anestesia registró estadísticamente menos expresión de c-fos que el grupo al que se le inyectó la formalina en las 5 láminas superficiales medulares y espinales (Tabla 96).

▪ Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos (Hist. 14)

La expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza en el núcleo caudal fue estadísticamente mayor que la asociada a la capsaicina y a la formalina. El aceite de mostaza fue un activador neuronal estadísticamente más potente que la capsaicina y la formalina en las láminas I-II, IV y V del núcleo caudal y del tercio rostral del asta dorsal de C1. Igualmente, el número de neuronas c-fos positivas fue significativamente mayor en la lámina III de Rexed tras la inyección de aceite de mostaza que tras la administración de formalina (Tabla 96).

La capsaicina indujo estadísticamente más expresión de c-fos que la formalina en la lámina III, observándose el efecto contrario en la lámina IV de Rexed (Tabla 96).

▪ **Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hist. 13)**

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo caudal fue significativamente menor tras la administración sistémica de baclofeno. Por el contrario, el faclofeno no indujo diferencias estadísticas (Tabla 95).

El aceite de mostaza tras la administración de baclofeno indujo significativamente menos inmunorreactividad de c-fos que el aceite de mostaza inyectado sin realizar ningún pretratamiento con agonistas del sistema GABA_B en las láminas I-V medulares y espinales (Tabla 95).

Por el contrario, la expresión de c-fos después de la inyección intraperitoneal de faclofeno no presentó diferencias estadísticas con la inducida únicamente por el aceite de mostaza (Tabla 95).

El número de neuronas activadas tras la administración de faclofeno fue significativamente mayor que el registrado tras el pretratamiento con baclofeno en las 5 láminas dorsales del núcleo caudal y del tercio rostral del asta dorsal de C1 (Tabla 95).

NÚCLEO CAUDAL Y C1						
Láminas	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
I-II	AM	3447	0,014	0,072	0,01	0,008
	AMB	1009	---	0,009	0,07	0,032
	AMF	1997	---	---	<0,001	<0,001
	Am	316	---	---	---	0,011
	An	122	---	---	---	---
III	AM	296	0,003	0,791	0,004	0,003
	AMB	69	---	0,001	0,086	0,023
	AMF	313	---	---	0,002	0,002
	Am	28	---	---	---	0,012
	An	8	---	---	---	---
IV	AM	133	0,004	0,061	0,004	0,003
	AMB	41	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	85	---	---	<0,001	<0,001
	Am	13	---	---	---	0,036
	An	4	---	---	---	---
V	AM	295	0,001	0,865	0,003	0,003
	AMB	60	---	<0,001	0,054	0,009
	AMF	288	---	---	<0,001	<0,001
	Am	45	---	---	---	0,007
	An	36	---	---	---	---
Total	AM	4171±631,2	0,01	0,1	<0,001	<0,001

Tabla 95. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

NÚCLEO CAUDAL Y C1						
Láminas	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
I-II	AM	3447	0,021	0,008	0,013	0,008
	CAP	1266	---	0,163	0,041	0,01
	FOR	868	---	---	0,009	<0,001
	SAL	496	---	---	---	<0,001
	An	122	---	---	---	---
III	AM	296	0,144	0,049	0,011	0,003
	CAP	217	---	0,033	<0,001	<0,001
	FOR	184	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	86	---	---	---	<0,001
	An	8	---	---	---	---
IV	AM	133	0,004	0,005	0,007	0,003
	CAP	39	---	0,013	<0,001	<0,001
	FOR	45	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	26	---	---	---	<0,001
	An	4	---	---	---	---
V	AM	295	0,015	0,011	0,013	0,003
	CAP	150	---	0,776	0,193	0,003
	FOR	143	---	---	0,221	0,002
	SAL	118	---	---	---	<0,001
	An	36	---	---	---	---
Total	AM	4171±631,2	0,021	0,009	0,002	<0,001

Tabla 96. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An).

d) Núcleos paratrigeminales**▪ Diferencias con los grupos control***Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 15-17)*

La inmunorreactividad de c-fos en los núcleos paratrigeminales fue significativamente mayor en el grupo de animales estimulado con aceite de mostaza que en el grupo que únicamente fue anestesiado o estimulado con aceite mineral (Tablas 97-99). El aceite de mostaza indujo un aumento significativo de la inmunorreactividad de c-fos en comparación con el aceite mineral o el grupo control con anestesia en el núcleo paratrigeminal rostral (séptimo nivel) (Tabla 97) y en los núcleos paratrigeminales ventral (tercero, quinto y sexto nivel) (Tabla 98) y dorsal (cuarto, quinto y sexto nivel) (Tabla 99).

Capsaicina versus control con solución salina y anestesia (Hists. 18-20)

Los cobayas estimulados con capsaicina presentaron estadísticamente más neuronas c-fos positivas, en relación con los animales a los que se les administró solución salina o únicamente anestesia, en el núcleo paratrigeminal rostral (octavo nivel) (Tabla 100) y en los núcleos paratrigeminales ventral (segundo, tercero, quinto y sexto nivel) (Tabla 101) y dorsal (primero, segundo, quinto y sexto nivel) (Tabla 102). Igualmente, un mayor grado de expresión de c-fos fue asociado a la capsaicina que a la solución salina en el tercer nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 102). Por el contrario, en el primer y segundo nivel del núcleo paratrigeminal rostral (Tabla 100) se observó mayor inmunorreactividad de c-fos asociada a la solución salina que a la capsaicina.

Formalina versus control con anestesia (Hists. 18-20)

La expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral (sexto y séptimo nivel) (Tabla 100) y en los núcleos paratrigeminales ventral (segundo, tercero, quinto y sexto nivel) (Tabla 101) y dorsal (quinto y sexto nivel) (Tabla 102) fue significativamente más manifiesta en el grupo donde se inyectó formalina que en el grupo control con anestesia.

▪ **Expresión de c-fos inducida por distintos irritantes químicos (Hists. 18-20)**

La expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza únicamente fue estadísticamente mayor que la asociada a la formalina en el núcleo paratrigeminal rostral (Tabla 100). Por el contrario, no se hallaron diferencias entre el aceite de mostaza y la capsaicina en ninguno de los núcleos paratrigeminales (Tabla 100-102).

La expresión de c-fos asociada al aceite de mostaza únicamente fue más manifiesta que tras la inyección de capsaicina o formalina en el núcleo paratrigeminal rostral (séptimo nivel) (Tabla 100) y ventral (tercer nivel) (Tabla 101). Igualmente, el aceite de mostaza indujo significativamente más neuronas c-fos positivas que la capsaicina en el sexto nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 102).

Comparado con la formalina, la capsaicina activó un mayor número de neuronas en los núcleos paratrigeminales ventral (tercer nivel) (Tabla 101) y dorsal (primer nivel) (Tabla 102). En el núcleo paratrigeminal rostral (Tabla 100) no se registraron diferencias estadísticas en la capacidad de estos dos irritantes para inducir inmunorreactividad de c-fos.

▪ **Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 15-17)**

El tratamiento sistémico con baclofeno o faclofeno no indujo diferencias estadísticas en el nivel de expresión de c-fos hallado en los núcleos paratrigeminales (Tablas 97-99).

La inmunorreactividad de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral (cuarto y quinto nivel) (Tabla 97) asociada a la inyección de aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno fue estadísticamente mayor que la registrada cuando únicamente se inyectó aceite de mostaza. Por el contrario, la administración de baclofeno indujo significativamente menos neuronas c-fos positivas que el aceite de mostaza sólo en los núcleos paratrigeminales ventral (tercer nivel) (Tabla 98) y dorsal (cuarto y sexto nivel) (Tabla 99).

El pretratamiento con faclofeno aumentó estadísticamente la expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral (cuarto nivel) (Tabla 97) y ventral (quinto y sexto nivel) (Tabla 98), mientras que en el núcleo paratrigeminal dorsal (sexto nivel) (Tabla 99) el número de neuronas activadas tras la administración de faclofeno fue significativamente menor que después de la inyección únicamente de aceite de mostaza.

En comparación con los cobayas en los que se realizó un pretratamiento con baclofeno, la inyección de aceite de mostaza después de la administración de faclofeno indujo estadísticamente más inmunorreactividad de c-fos en los núcleos paratrigeminales ventral (primero, tercero y sexto nivel) (Tabla 98) y dorsal (segundo, tercero y cuarto nivel) (Tabla 99); mientras que el efecto contrario fue registrado en el núcleo paratrigeminal rostral (sexto nivel) (Tabla 97).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	0	1	1	1	1
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	0	ND	0,05	ND	ND
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	1	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	0	0,019	0,007	ND	ND
	AMB	2	---	0,19	0,043	0,043
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	0	0,034	0,052	1	1
	AMB	4	---	1	0,065	0,065
	AMF	4	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	21	0,816	0,243	0,083	0,083
	AMB	23	---	0,001	<0,001	<0,001
	AMF	10	---	---	0,013	0,013
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	29	0,322	0,115	0,002	0,002
	AMB	23	---	0,459	0,003	0,003
	AMF	19	---	---	0,006	0,006
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	11	0,353	0,664	0,074	0,074
	AMB	17	---	0,411	0,02	0,02
	AMF	13	---	---	0,001	0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	61±10,3	0,656	0,247	0,049	0,049

Tabla 97. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	5	1	0,412	0,356	0,477
	AMB	5	---	0,013	0,001	<0,001
	AMF	8	---	---	0,001	0,002
	Am	1	---	---	---	0,225
	An	2	---	---	---	---
Segundo	AM	18	0,175	0,275	0,197	0,155
	AMB	4	---	0,072	0,053	0,003
	AMF	7	---	---	0,02	0,005
	Am	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	36	0,046	0,658	0,006	0,007
	AMB	20	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	39	---	---	<0,001	<0,001
	Am	3	---	---	---	0,158
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	87	0,28	0,38	0,121	0,124
	AMB	40	---	0,274	0,006	0,007
	AMF	50	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	2	---	---	---	---
Quinto	AM	96	0,683	0,042	0,004	0,004
	AMB	107	---	0,212	0,009	0,01
	AMF	137	---	---	<0,001	<0,001
	Am	6	---	---	---	0,428
	An	8	---	---	---	---
Sexto	AM	75	0,333	<0,001	0,001	0,001
	AMB	86	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	167	---	---	<0,001	<0,001
	Am	5	---	---	---	0,622
	An	6	---	---	---	---
Total	AM	317±97,4	0,538	0,267	0,041	0,034

Tabla 98. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	2	0,267	0,522	0,286	0,286
	AMB	4	---	0,315	0,009	0,009
	AMF	3	---	---	0,002	0,002
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	6	0,157	1	0,228	0,159
	AMB	1	---	0,001	1	0,093
	AMF	6	---	---	0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,04
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	13	0,225	1	0,171	0,246
	AMB	5	---	0,004	0,124	0,521
	AMF	13	---	---	0,001	0,002
	Am	2	---	---	---	0,151
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	17	0,021	0,431	0,038	0,038
	AMB	1	---	0,013	0,093	0,093
	AMF	24	---	---	0,027	0,027
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	18	1	0,565	0,003	0,001
	AMB	18	---	0,732	0,056	0,031
	AMF	20	---	---	0,002	0,001
	Am	3	---	---	---	0,007
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	15	0,014	0,009	0,006	0,002
	AMB	7	---	1	0,133	0,032
	AMF	7	---	---	0,088	0,009
	Am	3	---	---	---	0,622
	An	2	---	---	---	---
Total	AM	71±16,4	0,073	0,961	0,043	0,039

Tabla 99. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	0	1	1	0,001	1
	CAP	0	---	ND	0,001	ND
	FOR	0	---	---	0,001	ND
	SAL	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	0	ND	ND	0,001	ND
	CAP	0	---	ND	0,001	ND
	FOR	0	---	---	0,001	ND
	SAL	2	---	---	---	0,004
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	0	ND	ND	ND	ND
	CAP	0	---	ND	ND	ND
	FOR	0	---	---	ND	ND
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	0	ND	ND	ND	ND
	CAP	0	---	ND	ND	ND
	FOR	0	---	---	ND	ND
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	0	0,058	1	1	1
	CAP	2	---	0,05	0,093	0,093
	FOR	0	---	---	ND	ND
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	21	0,931	0,083	0,14	0,083
	CAP	22	---	0,05	0,093	0,053
	FOR	4	---	---	ND	<0,001
	SAL	4	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	29	0,016	0,04	0,004	0,002
	CAP	10	---	0,088	0,248	0,081
	FOR	18	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	4	---	---	---	<0,001
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	11	0,296	0,233	0,074	0,074
	CAP	6	---	0,684	0,017	0,017
	FOR	5	---	---	0,07	0,07
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Total	AM	61±10,3	0,114	0,025	0,041	0,049

Tabla 100. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	5	0,542	0,795	0,808	0,477
	CAP	8	---	0,315	0,348	0,181
	FOR	4	---	---	1	0,348
	SAL	4	---	---	---	0,004
	An	2	---	---	---	---
Segundo	AM	18	0,676	0,541	0,221	0,155
	CAP	14	---	0,359	<0,001	<0,001
	FOR	12	---	---	0,009	0,003
	SAL	3	---	---	---	0,001
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	36	0,042	0,019	0,006	0,007
	CAP	20	---	0,023	<0,001	<0,001
	FOR	16	---	---	<0,001	<0,001
	SAL	3	---	---	---	0,04
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	87	0,262	0,126	0,135	0,124
	CAP	36	---	0,252	0,114	0,09
	FOR	17	---	---	0,159	0,093
	SAL	5	---	---	---	0,001
	An	2	---	---	---	---
Quinto	AM	96	0,214	0,684	0,005	0,004
	CAP	70	---	0,479	0,007	0,005
	FOR	86	---	---	0,017	0,014
	SAL	11	---	---	---	0,001
	An	8	---	---	---	---
Sexto	AM	75	0,755	0,922	0,002	0,001
	CAP	82	---	0,856	0,033	0,022
	FOR	77	---	---	0,029	0,019
	SAL	14	---	---	---	<0,001
	An	6	---	---	---	---
Total	AM	317±97,4	0,371	0,269	0,029	0,034

Tabla 101. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X±SEM	p			
			CAP	FOR	SAL	An
Primero	AM	2	0,05	1	0,286	0,286
	CAP	6	---	0,013	0,002	0,002
	FOR	2	---	---	0,093	0,093
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	6	1	0,586	0,159	0,159
	CAP	6	---	0,315	0,002	0,002
	FOR	4	---	---	0,093	0,093
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	13	0,276	0,217	0,116	0,246
	CAP	6	---	0,315	0,002	0,093
	FOR	5	---	---	<0,001	0,093
	SAL	0	---	---	---	<0,001
	An	4	---	---	---	---
Cuarto	AM	17	0,412	0,189	0,038	0,038
	CAP	11	---	0,608	0,093	0,093
	FOR	8	---	---	0,093	0,093
	SAL	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	18	0,13	0,422	0,003	0,001
	CAP	12	---	0,161	0,027	0,009
	FOR	25	---	---	0,062	0,042
	SAL	3	---	---	---	0,001
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	15	0,005	0,799	0,006	0,002
	CAP	7	---	0,078	0,009	<0,001
	FOR	14	---	---	0,067	0,027
	SAL	5	---	---	---	0,001
	An	2	---	---	---	---
Total	AM	71±16,4	0,238	0,535	0,032	0,039

Tabla 102. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), la capsaicina (CAP), la formalina (FOR), la solución salina (SAL) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

e) Complejo parabraquial**▪ Diferencias con los grupos control***Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hist. 21)*

La inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial fue estadísticamente mayor en el grupo de animales estimulado con aceite de mostaza que en el grupo que únicamente fue anestesiado o estimulado con aceite mineral. El número de neuronas c-fos positivas en los tres núcleos estudiados del complejo parabraquial fue significativamente mayor en los animales estimulados con aceite de mostaza que en los que se inyectó aceite mineral o se administró únicamente anestesia (Tabla 103).

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hist. 21)

La inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial fue significativamente menor tras la administración sistémica de baclofeno. Por el contrario, el baclofeno no indujo diferencias estadísticas (Tabla 103).

Los cobayos estimulados con el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno presentaron una disminución estadística de la expresión de c-fos en comparación a los que únicamente se administró aceite de mostaza en el núcleo parabraquial lateral y núcleo de Kölliker-Fuse, pero no en el núcleo parabraquial medial (Tabla 103).

Por el contrario, en ninguno de los núcleos del complejo parabraquial se hallaron diferencias significativas en la inmunorreactividad de c-fos inducida por el aceite de mostaza y aquella asociada al aceite de mostaza tras la administración de baclofeno (Tabla 103).

El pretratamiento con baclofeno activó estadísticamente más neuronas en el núcleo de Kölliker-Fuse y núcleo parabraquial medial que el pretratamiento con aceite de mostaza (Tabla 103).

COMPLEJO PARABRAQUIAL						
Láminas	Estímulo	X±SEM	p			
			AMB	AMF	Am	An
Parabraquial lateral	AM	900	0,011	0,204	0,012	0,009
	AMB	318	---	0,059	0,019	<0,001
	AMF	610	---	---	0,031	0,02
	Am	156	---	---	---	0,537
	An	118	---	---	---	---
Kölliker-Fuse	AM	123	0,022	0,209	0,027	0,012
	AMB	54	---	<0,001	0,123	<0,001
	AMF	156	---	---	<0,001	<0,001
	Am	34	---	---	---	0,385
	An	20	---	---	---	---
Parabraquial medial	AM	176	0,089	0,986	0,03	0,023
	AMB	88	---	0,041	0,006	0,002
	AMF	175	---	---	0,011	0,008
	Am	25	---	---	---	0,294
	An	14	---	---	---	---
Total	AM	1199±315	0,017	0,385	0,008	0,003

Tabla 103. Neuronas ipsilaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

4.4.2. Contralateral

a) Núcleo oral del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo oral

▪ Diferencias con los grupos control

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 22-24)

Los animales estimulados con aceite de mostaza presentaron un aumento significativo de la expresión de c-fos en comparación con el grupo de cobayas a los que se les inyectó aceite mineral o el grupo que únicamente fue anestesiado, en el núcleo oral ventral (tercero y cuarto nivel) (Tabla 104) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (cuarto y sexto nivel) (Tabla 105). Por el contrario, no se registraron diferencias estadísticas entre dichos grupos en el núcleo oral dorsal (Tabla 106).

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 22-24)

La estimulación con aceite de mostaza tras la administración de baclofeno indujo una disminución significativa del número de neuronas c-fos positivas en comparación con el grupo donde sólo se aplicó el aceite de mostaza en el núcleo oral ventral (tercero, cuarto) (Tabla 104) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (cuarto y sexto nivel) (Tabla 105). En el núcleo oral dorsal no se registraron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos (Tabla 106).

Igualmente, en los animales estimulados tras el pretratamiento con faclofeno se observó un reducción significativa de la inmunorreactividad de c-fos en el tercer y cuarto nivel del núcleo oral ventral (Tabla 104) y en el cuarto nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (Tabla 105), registrándose el efecto contrario en el cuarto nivel del núcleo oral dorsal (Tabla 106).

El número de neuronas con expresión de c-fos en el tercio caudal del núcleo oral ventral (Tabla 104), en el núcleo oral dorsal (cuarto, quinto, sexto y octavo nivel) (Tabla 106) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral (quinto, sexto y séptimo nivel) (Tabla 105) tras la administración de faclofeno fue estadísticamente mayor que el registrado tras el pretratamiento con baclofeno.

NÚCLEO ORAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	1	0,252	0,252	0,286	0,286
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	1	0,007	0,007	0,02	0,02
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	2	0,019	0,019	0,043	0,043
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	2	0,1	0,1	0,162	0,162
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	4	0,05	0,119	0,093	0,093
	AMB	0	---	0,007	ND	ND
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	10	0,244	0,355	0,279	0,279
	AMB	1	---	0,025	0,02	0,02
	AMF	3	---	---	0,01	0,01
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	15	0,252	0,303	0,286	0,286
	AMB	0	---	0,027	ND	ND
	AMF	3	---	---	0,057	0,057
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---

Tabla 104. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO ORAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	3	0,05	0,522	0,093	0,226
	AMB	0	---	0,05	ND	0,02
	AMF	2	---	---	0,093	0,348
	Am	0	---	---	---	0,04
	An	1	---	---	---	---
Segundo	AM	12	0,082	0,06	0,085	0,085
	AMB	2	---	0,315	0,093	0,093
	AMF	1	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	19	0,514	0,246	0,252	0,274
	AMB	10	---	0,132	0,081	0,107
	AMF	3	---	---	0,057	0,162
	Am	0	---	---	---	0,04
	An	1	---	---	---	---
Cuarto	AM	15	0,037	0,015	0,021	0,021
	AMB	4	---	0,297	0,093	0,093
	AMF	2	---	---	0,043	0,043
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	8	0,06	0,312	0,075	0,075
	AMB	1	---	<0,001	0,02	0,02
	AMF	4	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	6	0,007	0,439	0,008	0,008
	AMB	1	---	<0,001	0,093	0,093
	AMF	5	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	10	0,166	1	0,185	0,076
	AMB	4	---	0,006	0,264	<0,001
	AMF	10	---	---	0,013	0,002
	Am	3	---	---	---	0,027
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	17	0,21	0,482	0,158	0,118
	AMB	6	---	0,154	0,143	0,04
	AMF	11	---	---	0,03	0,013
	Am	2	---	---	---	0,086
	An	0	---	---	---	---

Tabla 105. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO ORAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	1	0,252	0,252	0,286	0,286
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	1	0,252	0,39	0,286	0,286
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	2	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	0	1	0,03	1	1
	AMB	0	---	0,007	ND	ND
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	1	0,252	0,072	0,286	0,286
	AMB	0	---	0,039	ND	ND
	AMF	7	---	---	0,077	0,077
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	5	0,092	0,272	0,151	0,151
	AMB	0	---	0,043	ND	ND
	AMF	11	---	---	0,082	0,082
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	6	0,261	0,712	0,262	0,262
	AMB	1	---	0,078	0,093	0,093
	AMF	8	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	1	0,331	0,203	0,413	0,413
	AMB	0	---	0,027	ND	ND
	AMF	3	---	---	0,057	0,057
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---

Tabla 106. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

b) Núcleo interpolar del trigémino y formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar**▪ Diferencias con los grupos control**

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 25-27)

El aceite de mostaza indujo significativamente más inmunorreactividad de c-fos en comparación con el aceite mineral o el grupo control con anestesia en el núcleo interpolar ventral (todos los niveles) (Tabla 107), en la mitad caudal del núcleo interpolar dorsal (Tabla 108) y en toda la extensión rostrocaudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 109).

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 25-27)

Los cobayas estimulados con el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno presentaron una reducción estadística de la expresión de c-fos en comparación con los cobayas a los que únicamente se les inyectó aceite de mostaza en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar ventral (Tabla 107), en los dos tercios caudales del núcleo interpolar dorsal (Tabla 108) y en la mitad caudal de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 109).

Por el contrario, tras la administración de baclofeno se observó un aumento significativo de las neuronas c-fos positivas en el sexto nivel del núcleo interpolar ventral (Tabla 107) y en el segundo nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 109), observándose el efecto contrario en el quinto nivel del núcleo interpolar dorsal (Tabla 108) y en el cuarto nivel de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (Tabla 109).

La inmunorreactividad de c-fos en toda la extensión rostrocaudal del núcleo interpolar ventral (Tabla 107), en la mitad caudal del núcleo interpolar dorsal (Tabla 108) y en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar (tercero, quinto y sexto nivel) (Tabla 109) tras el pretratamiento con baclofeno fue estadísticamente mayor que la registrada tras la administración de baclofeno.

NÚCLEO INTERPOLAR VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	9	<0,001	1	0,007	0,003
	AMB	1	---	0,032	0,368	0,02
	AMF	9	---	---	0,103	0,093
	Am	2	---	---	---	1
	An	2	---	---	---	---
Segundo	AM	21	0,043	0,764	0,033	0,033
	AMB	6	---	0,004	0,01	0,009
	AMF	19	---	---	0,002	0,002
	Am	1	---	---	---	1
	An	1	---	---	---	---
Tercero	AM	24	0,015	0,683	0,017	0,033
	AMB	5	---	0,012	0,042	1
	AMF	21	---	---	0,011	0,025
	Am	1	---	---	---	<0,001
	An	5	---	---	---	---
Cuarto	AM	21	0,002	0,711	0,002	0,002
	AMB	4	---	0,006	0,093	0,181
	AMF	23	---	---	0,006	0,007
	Am	0	---	---	---	0,04
	An	1	---	---	---	---
Quinto	AM	34	0,006	0,688	0,002	0,002
	AMB	11	---	0,046	0,023	0,032
	AMF	39	---	---	0,029	0,031
	Am	0	---	---	---	0,04
	An	1	---	---	---	---
Sexto	AM	27	0,033	0,027	0,042	0,041
	AMB	5	---	<0,001	0,301	0,269
	AMF	51	---	---	<0,001	<0,001
	Am	2	---	---	---	1
	An	2	---	---	---	---

Tabla 107. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

NÚCLEO INTERPOLAR DORSAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	3	0,334	0,334	0,237	0,237
	AMB	1	---	1	0,02	0,02
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	6	0,128	0,499	0,074	0,074
	AMB	2	---	0,272	0,001	0,001
	AMF	4	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	6	0,032	0,272	0,066	0,066
	AMB	0	---	0,05	ND	ND
	AMF	3	---	---	0,093	0,093
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	4	0,041	0,42	0,026	0,026
	AMB	1	---	<0,001	0,093	0,093
	AMF	5	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	8	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
	AMB	0	---	<0,001	ND	ND
	AMF	3	---	---	0,002	0,002
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	1	0,007	0,085	0,02	0,02
	AMB	0	---	0,032	ND	ND
	AMF	4	---	---	0,065	0,065
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---

Tabla 108. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

FORMACIÓN RETICULAR VENTRAL ADYACENTE AL NÚCLEO INTERPOLAR						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	35	0,804	1	0,001	0,001
	AMB	33	---	0,812	0,032	0,032
	AMF	35	---	---	0,002	0,002
	Am	8	---	---	---	1
	An	8	---	---	---	---
Segundo	AM	28	0,167	0,004	0,002	0,001
	AMB	37	---	0,25	0,002	0,002
	AMF	43	---	---	<0,001	<0,001
	Am	5	---	---	---	0,241
	An	3	---	---	---	---
Tercero	AM	63	0,058	0,359	0,034	0,028
	AMB	24	---	0,002	<0,001	<0,001
	AMF	46	---	---	<0,001	<0,001
	Am	6	---	---	---	0,06
	An	3	---	---	---	---
Cuarto	AM	83	0,027	0,026	0,011	0,009
	AMB	35	---	0,833	0,009	0,002
	AMF	36	---	---	0,001	<0,001
	Am	8	---	---	---	0,527
	An	5	---	---	---	---
Quinto	AM	108	0,01	0,073	0,008	0,01
	AMB	31	---	0,012	<0,001	<0,001
	AMF	60	---	---	0,002	0,003
	Am	4	---	---	---	0,026
	An	9	---	---	---	---
Sexto	AM	81	0,047	0,286	0,003	0,001
	AMB	56	---	<0,001	<0,001	<0,001
	AMF	93	---	---	<0,001	<0,001
	Am	16	---	---	---	0,026
	An	4	---	---	---	---

Tabla 109. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

c) Núcleo caudal del trigémino y primer segmento cervical**▪ Diferencias con los grupos control**

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hist. 28)

El número de neuronas c-fos positivas en las 5 láminas superficiales del núcleo caudal y del tercio rostral del asta dorsal del primer segmento cervical (C1), fue significativamente mayor después de la inyección de aceite de mostaza que tras la estimulación con aceite mineral o la administración únicamente de anestesia (Tabla 110).

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hist. 28)

Los cobayos estimulados con aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno presentaron una disminución estadística de la expresión de c-fos, en comparación con los animales a los que únicamente se les inyectó aceite de mostaza, en las láminas I-II, III y V de Rexed (Tabla 110).

Igualmente, la administración de baclofeno indujo una reducción significativa de la inmunoreactividad de c-fos en las 5 láminas dorsales medulares y espinales (Tabla 110).

El pretratamiento con baclofeno activó estadísticamente más neuronas en la lámina III que el pretratamiento con aceite de mostaza, registrándose el efecto contrario en la lámina IV de Rexed (Tabla 110).

NÚCLEO CAUDAL Y C1						
Láminas	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
I-II	AM	784	0,007	0,007	0,009	0,009
	AMB	212	---	0,589	0,361	0,372
	AMF	252	---	---	0,064	0,034
	Am	131	---	---	---	0,832
	An	140	---	---	---	---
III	AM	124	0,003	0,01	0,009	0,012
	AMB	14	---	0,038	0,348	0,004
	AMF	36	---	---	0,093	0,269
	Am	16	---	---	---	<0,001
	An	24	---	---	---	---
IV	AM	69	0,055	0,003	0,011	0,005
	AMB	37	---	0,006	0,024	0,004
	AMF	10	---	---	0,646	0,018
	Am	12	---	---	---	0,026
	An	0	---	---	---	---
V	AM	163	0,005	0,004	0,014	0,014
	AMB	41	---	0,617	1	0,858
	AMF	37	---	---	0,612	0,521
	Am	41	---	---	---	0,595
	An	42	---	---	---	---

Tabla 110. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

d) Núcleos paratrigeminales**▪ Diferencias con los grupos control**

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hists. 29-31)

El núcleo paratrigeminal rostral no presentó diferencias significativas entre la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza y aquella asociada al aceite mineral o a la anestesia (Tabla 111).

Por el contrario, la inmunorreactividad de c-fos inducida por el aceite de mostaza fue estadísticamente mayor que la debida al aceite mineral y a la anestesia, en el quinto nivel del núcleo paratrigeminal ventral (Tabla 112) y en la mitad caudal del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113). Además, el aceite de mostaza activó significativamente más neuronas que la anestesia en el segundo y tercer nivel del núcleo paratrigeminal ventral (Tabla 112). Por el contrario, en el primer nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113) se observaron estadísticamente menos neuronas c-fos positivas tras la inyección de aceite de mostaza que después de la administración de anestesia.

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hists. 29-31)

El aceite de mostaza tras la administración de baclofeno indujo significativamente menos expresión de c-fos que el aceite de mostaza inyectado sin realizar ningún pretratamiento con agonistas del sistema GABA_B, en la mitad caudal del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113). Por el contrario, en el primer nivel de dicho núcleo se observó el efecto inverso (Tabla 113). La administración de baclofeno no indujo niveles de inmunorreactividad de c-fos estadísticamente diferentes de los registrados cuando únicamente se inyectó aceite de mostaza en el núcleo paratrigeminal ventral (Tabla 112).

El aceite de mostaza inyectado tras el pretratamiento con baclofeno, en comparación a cuando únicamente se administró el irritante químico, activó significativamente más neuronas en el primer nivel del núcleo paratrigeminal ventral (Tabla 112) y en el segundo nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113), pero estadísticamente menos en el sexto nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113). La expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal rostral después de la inyección

intraperitoneal de faclofeno o baclofeno, no presentó diferencias significativas con la inducida únicamente por el aceite de mostaza (Tabla 111).

El número de neuronas c-fos positivas tras la administración de faclofeno fue estadísticamente mayor que el registrado tras el pretratamiento con baclofeno, en el núcleo paratrigeminal rostral (sexto nivel) (Tabla 111) y en los núcleos paratrigeminales ventral (primero y sexto nivel) (Tabla 112) y dorsal (segundo, quinto y sexto nivel) (Tabla 113), observándose el efecto contrario en el tercer nivel del núcleo paratrigeminal dorsal (Tabla 113).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL ROSTRAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Segundo	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	0	ND	ND	ND	ND
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	1	0,128	1	0,138	0,138
	AMB	0	---	0,007	ND	ND
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Séptimo	AM	6	0,601	0,185	0,188	0,188
	AMB	4	---	0,085	0,065	0,065
	AMF	1	---	---	0,02	0,02
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Octavo	AM	6	0,069	0,069	0,121	0,121
	AMB	0	---	ND	ND	ND
	AMF	0	---	---	ND	ND
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---

Tabla 111. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

NÚCLEO PARATRIGEMINAL VENTRAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	3	1	0,034	0,421	0,673
	AMB	3	---	<0,001	0,188	0,45
	AMF	10	---	---	<0,001	<0,001
	Am	1	---	---	---	0,158
	An	2	---	---	---	---
Segundo	AM	10	0,268	0,357	0,07	0,049
	AMB	6	---	0,547	0,065	0,032
	AMF	7	---	---	0,001	<0,001
	Am	2	---	---	---	0,04
	An	1	---	---	---	---
Tercero	AM	14	0,628	0,604	0,054	0,048
	AMB	12	---	1	0,011	0,006
	AMF	12	---	---	0,002	<0,001
	Am	3	---	---	---	1
	An	3	---	---	---	---
Cuarto	AM	49	0,239	0,473	0,113	0,096
	AMB	22	---	0,152	0,011	0,006
	AMF	33	---	---	0,005	0,003
	Am	3	---	---	---	0,001
	An	0	---	---	---	---
Quinto	AM	61	0,306	0,781	0,034	0,029
	AMB	38	---	0,131	0,053	0,04
	AMF	67	---	---	0,006	0,005
	Am	3	---	---	---	0,158
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	111	0,106	0,2	0,093	0,088
	AMB	27	---	0,032	0,043	0,032
	AMF	48	---	---	<0,001	<0,001
	Am	4	---	---	---	0,158
	An	2	---	---	---	---

Tabla 112. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

NÚCLEO PARATRIGEMINAL DORSAL						
Nivel	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Primero	AM	0	<0,001	0,05	ND	0,001
	AMB	2	---	1	0,001	ND
	AMF	2	---	---	0,093	1
	Am	0	---	---	---	0,004
	An	2	---	---	---	---
Segundo	AM	1	0,128	0,01	0,138	0,138
	AMB	2	---	0,007	0,001	0,001
	AMF	3	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Tercero	AM	6	0,462	0,165	0,319	0,239
	AMB	3	---	<0,001	0,033	0,002
	AMF	0	---	---	0,093	ND
	Am	1	---	---	---	0,158
	An	0	---	---	---	---
Cuarto	AM	19	0,023	0,09	0,022	0,032
	AMB	4	---	0,172	0,009	0,093
	AMF	8	---	---	0,04	0,093
	Am	0	---	---	---	0,004
	An	2	---	---	---	---
Quinto	AM	14	0,007	0,155	0,004	0,004
	AMB	4	---	0,002	0,009	0,009
	AMF	10	---	---	<0,001	<0,001
	Am	0	---	---	---	ND
	An	0	---	---	---	---
Sexto	AM	11	<0,001	0,015	0,011	0,001
	AMB	1	---	0,002	0,247	0,093
	AMF	6	---	---	0,146	0,002
	Am	3	---	---	---	0,158
	An	0	---	---	---	---

Tabla 113. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An). ND: no diferencias significativas.

e) Complejo parabraquial**▪ Diferencias con los grupos control**

Aceite de mostaza versus control con aceite mineral y anestesia (Hist. 32)

El aceite de mostaza indujo un aumento significativo de la inmunorreactividad de c-fos en comparación con el aceite mineral o el grupo control con anestesia en los tres núcleos del complejo parabraquial analizados (Tabla 114).

▪ Efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza (Hist. 32)

La expresión de c-fos asociada a la inyección de aceite de mostaza tras la administración de baclofeno sólo fue estadísticamente menor que la registrada cuando únicamente se inyectó aceite de mostaza en el núcleo parabraquial lateral (Tabla 114).

Por el contrario, en ninguno de los núcleos del complejo parabraquial se hallaron diferencias significativas entre el número de neuronas c-fos positivas inducidas por el aceite de mostaza y aquellas asociadas al aceite de mostaza tras el pretratamiento con el antagonista del sistema GABA_B (Tabla 114).

En comparación con los cobayas a los que se les administró baclofeno, la inyección de aceite de mostaza después del pretratamiento con baclofeno indujo estadísticamente más inmunorreactividad de c-fos en el núcleo parabraquial lateral y en el núcleo de Kölliker-Fuse (Tabla 114).

COMPLEJO PARABRAQUIAL						
Núcleo	Estímulo	X	p			
			AMB	AMF	Am	An
Parabraquial lateral	AM	727	0,007	0,29	0,006	0,003
	AMB	330	---	0,018	0,05	0,002
	AMF	587	---	---	0,01	0,004
	Am	175	---	---	---	0,617
	An	142	---	---	---	---
Kölliker-Fuse	AM	126	0,124	0,504	0,02	0,017
	AMB	75	---	0,005	0,059	0,047
	AMF	143	---	---	<0,001	<0,001
	Am	30	---	---	---	0,313
	An	27	---	---	---	---
Parabraquial medial	AM	112	0,148	0,895	0,014	0,016
	AMB	75	---	0,164	0,001	0,001
	AMF	108	---	---	0,012	0,014
	Am	17	---	---	---	0,34
	An	22	---	---	---	---

Tabla 114. Neuronas contralaterales c-fos positivas. Están representadas el número de neuronas activadas por el aceite de mostaza (AM), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno (AMB), el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno (AMF), el aceite mineral (Am) y la anestesia (An).

4.5. Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino de la rata

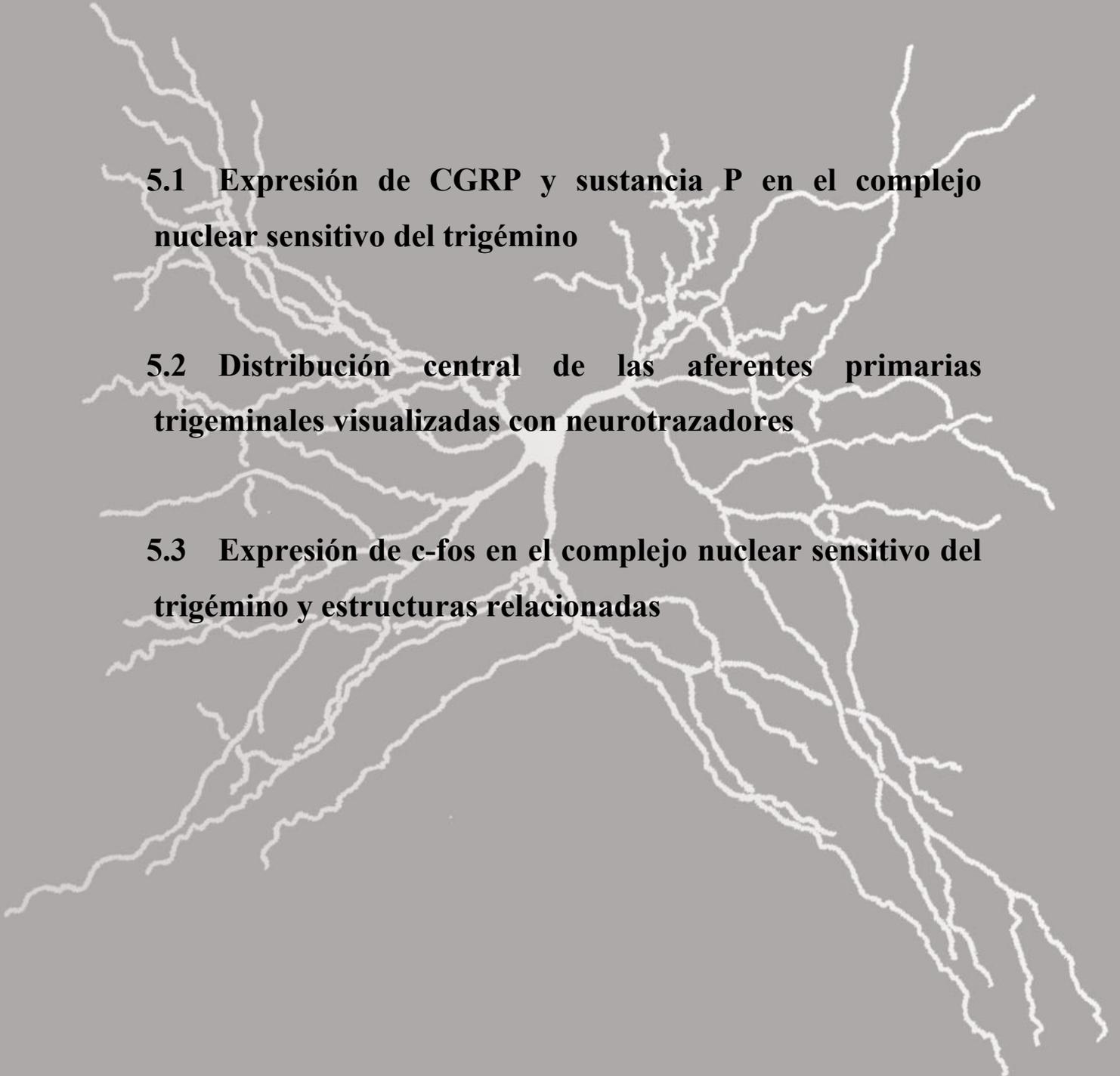
En las ratas en las que se aplicó el aceite de mostaza en la región izquierda de las vibrisas para comparar los datos con los obtenidos en el cobaya, se obtuvo una excelente expresión de c-fos en diversos núcleos del tallo nervioso de un modo similar a lo hallado por otros autores con estimulación eléctrica (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1998a) u otros irritantes químicos (Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995). En el complejo parabraquial se observó expresión bilateral de c-fos, fundamentalmente en los núcleos laterales y en el núcleo de Kölliker-Fuse (Figs. 12A-B). En el complejo parabraquial contralateral destacó la densidad de núcleos c-fos positivos en los subnúcleos lateral externo y medial externo (Fig. 12B). Dentro del complejo nuclear sensitivo del trigémino no hallamos prácticamente expresión de c-fos hasta la región limítrofe entre el núcleo interpolar y el núcleo caudal, es decir, no observamos, a diferencia de otros autores (Mineta *et al.*, 1995), inmunorreactividad de c-fos en el núcleo principal, en el núcleo oral ventral ni en la mitad rostral del núcleo interpolar. Sin embargo, hallamos expresión de c-fos en la formación reticular limítrofe medialmente con los territorios ventrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, así se observaron núcleos marcados en el espacio reticular que se halla entre los núcleos motores del facial y la agrupación ventral del núcleo oral del trigémino (Fig. 12C). En el núcleo caudal, la expresión de c-fos fue muy intensa en las láminas más superficiales (I-II), existiendo también núcleos en las láminas más profundas (IV-V) (Fig. 12D). No hemos hallado prácticamente núcleos en la lámina III.

5. Discusión

5.1 Expresión de CGRP y sustancia P en el complejo nuclear sensitivo del trigémino

5.2 Distribución central de las aferentes primarias trigeminales visualizadas con neurotrazadores

5.3 Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y estructuras relacionadas



5.1. Expresión de CGRP y sustancia P en el complejo nuclear sensitivo del trigémino

5.1.1. CGRP

Los resultados de nuestro estudio en el cobaya confirman que en los mamíferos existe una densa proyección de fibras CGRP positivas en las láminas I y IIo del asta dorsal medular (Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a) y del asta dorsal espinal (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Carlton *et al.*, 1988; Conrath *et al.*, 1989; Kawata *et al.*, 1989; Marlier *et al.*, 1990; Merighi *et al.*, 1990; Sugimoto *et al.*, 1997a). Aparte de la manifiesta inmunorreactividad de CGRP registrada en las láminas superficiales del asta dorsal, en el cobaya también se han visto proyecciones discontinuas hacia láminas más profundas. En este sentido cabe señalar la presencia de fibras CGRP positivas en la lámina III de la médula espinal y del tercio caudal del núcleo caudal del trigémino, las cuales también han sido descritas en monos (Carlton *et al.*, 1988), caballos y cerdos (Merighi *et al.*, 1990) pero no en ratas (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Conrath *et al.*, 1989; Marlier *et al.*, 1990). A diferencia del mono (Carlton *et al.*, 1988) y de la rata (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Conrath *et al.*, 1989), en el cobaya no se ha visto la presencia consistente de fibras CGRP positivas en la región reticulada de la lámina V de la médula espinal, y, de la misma forma, también son escasas las arborizaciones terminales de fibras CGRP positivas en la lámina V del núcleo caudal, las cuales son más evidentes en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) y en el gato (Henry *et al.*, 1996). De hecho, las proyecciones más profundas en el asta dorsal medular y espinal observadas en el cobaya suelen hallarse en el límite entre las láminas IV y V. Al igual de lo que ha sido descrito en ratas (Conrath *et al.*, 1989) y en otros mamíferos (Kawata *et al.*, 1989; Merighi *et al.*, 1990), nosotros también hemos observado terminales CGRP positivas en el tracto de Lissauer, en el territorio denominado como islas intersticiales de Cajal que hoy se interpretan como prolongaciones hacia este tracto de la lámina I.

Analizando la distribución de CGRP en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino y zonas limítrofes, discutiremos, en el primer lugar, su localización en el **núcleo principal del trigémino**. La expresión de CGRP descrita en la subdivisión dorsal del núcleo principal de la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) es más densa que la observada en el gato (Henry *et al.*, 1996) y que la hallada por nosotros en el cobaya. Sin embargo, la distribución de fibras CGRP positivas en el núcleo principal es

más amplia en el gato (Henry *et al.*, 1996) y en el cobaya que en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a), puesto que en las dos primeras especies también se han observado fibras aisladas en la división ventral del núcleo principal. En el subnúcleo principal dorsal de la rata existe expresión de CGRP en toda la periferia de la subdivisión dorsal, tanto medial como lateralmente (Sugimoto *et al.*, 1997a), mientras que, por el contrario, en el cobaya y en el gato (Henry *et al.*, 1996) las terminales CGRP adoptan una posición claramente lateral, inmediatamente contigua al tracto espinal trigeminal.

El cobaya presenta notables diferencias con respecto a la rata y al gato en lo referente a la inmunorreactividad de CGRP registrada en el **núcleo oral del trigémino**. En la rata únicamente se ha descrito una densa proyección de fibras CGRP positivas en la mitad dorsal del núcleo oral (Sugimoto *et al.*, 1997a, 1998a). Sin embargo, en el cobaya y en el gato (Henry *et al.*, 1996) también existen, aunque con una distribución más laxa, fibras con CGRP en la mitad ventral del núcleo oral, especialmente en la región caudal del mismo. En relación al **núcleo oral dorsal**, la mayor expresión de CGRP se concentra en la región dorsomedial en el gato (Henry *et al.*, 1996), en la zona dorsolateral en el cobaya y en ambas localizaciones en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a, 1998a). Los acúmulos discontinuos de expresión de CGRP en el **núcleo oral ventral** se hallan preferentemente en la zona medial en el gato (Henry *et al.*, 1996), mientras que en el cobaya se hallan en la región lateral y dentro del tracto espinal trigeminal. Esta localización en la región ventrolateral del núcleo oral caudal del cobaya se solapa con el territorio donde hemos visto expresión de c-fos tras la estimulación periférica nociceptiva. Sin embargo, con los trazadores neuroanatómicos IB4-HRP y CTb-HRP no hemos detectado en el cobaya terminaciones aferentes primarias trigeminales en dicha región.

En el cobaya, en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) y en el gato (Henry *et al.*, 1996), la expresión de CGRP a la altura del **núcleo interpolar del trigémino** es más manifiesta en la mitad caudal que en la mitad rostral del mismo. Esta localización en la región caudal del núcleo interpolar del cobaya se solapa con el territorio donde hemos visto expresión de c-fos tras la estimulación de las vibrisas. La expresión de CGRP en la rata se distribuye uniformemente a lo largo de todo el borde medial del núcleo interpolar, siendo máxima en el polo dorsal (Sugimoto *et al.*, 1997a). Por el contrario, la inmunorreactividad de CGRP en el gato (Henry *et al.*, 1996) y en el cobaya adopta una distribución discontinua en dicho núcleo. Mientras que en el gato se ha registrado en la región ventrolateral y dorsomedial, en el cobaya preferentemente la hemos observado en

la región ventromedial y dorsolateral del núcleo interpolar. En el gato (Henry *et al.*, 1996) y en el cobaya existe una densa proyección de fibras con CGRP hacia los núcleos paratrigeminales ventral y dorsal; sin embargo, en la rata únicamente han sido descritas fibras CGRP positivas alcanzando el núcleo paratrigeminal dorsal (Sugimoto *et al.*, 1997a), puesto que en esta especie no se reconoce la existencia de un núcleo paratrigeminal ventral. Resaltamos que en el cobaya como en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) existe también una densa proyección de fibras con CGRP en la zona marginal de la región caudal del núcleo interpolar. Dicha proyección se continúa con los núcleos paratrigeminales mencionados.

Fuera del complejo nuclear sensitivo del trigémino y del asta dorsal de la médula espinal cervical y al igual de lo que ha sido descrito en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) y en el gato (Henry *et al.*, 1996), en el cobaya existen abundantes fibras con CGRP en el núcleo del fascículo solitario. Por otro lado, en línea con los hallazgos obtenidos por Sugimoto *et al.* (1997a) en la rata, hemos observado en el cobaya una proyección de fibras CGRP positivas hacia la formación reticular parvocelular, tanto a nivel ventral como a nivel dorsal. A nivel de la región caudal del núcleo oral del trigémino y también en niveles rostrales del núcleo interpolar, las arborizaciones terminales observadas por nosotros en la formación reticular lateral ventral del cobaya, también han sido descritas en la rata por Sugimoto *et al.* (1997a).

A la altura del **complejo parabraquial**, en la rata no se han descrito diferencias en cuanto al número de fibras CGRP positivas que reciben las distintas agrupaciones neuronales que conforman dicho complejo (Sugimoto *et al.*, 1997a). Este hallazgo contrasta con los resultados del presente estudio, donde se registró una clara preferencia de las fibras con inmunorreactividad de CGRP por los núcleos parabraquial medial y parabraquial medial externo.

La moderada positividad para CGRP que hemos observado en las motoneuronas de los núcleos motores craneales, como los del trigémino, del abducens, del facial y del hipogloso, así como en las motoneuronas de la médula espinal del cobaya, coincide con lo mencionado previamente por Réthelyi *et al.* (1989b). De manera análoga a lo observado en el cobaya, en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) y en el gato (Henry *et al.*, 1996) se han descrito la presencia de CGRP en las motoneuronas de los núcleos motores craneales; observándose igualmente inmunorreactividad para CGRP en las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal del gato (Henry *et al.*, 1996), de la

rata (Conrath *et al.*, 1989; Réthelyi *et al.*, 1989b; Marlier *et al.*, 1990; Sugimoto *et al.*, 1997a) y de otros mamíferos (Merighi *et al.*, 1990).

A modo de resumen, la distribución de CGRP en el sistema nervioso central del cobaya, y particularmente la que nosotros hemos observado en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, constituye una evidencia más de la mayor proximidad entre el cobaya y los mamíferos superiores. En este sentido cabe destacar la presencia en cobayas y monos, pero no en ratas, de fibras CGRP positivas en la lámina III de la médula espinal. Por otro lado, ya dentro del complejo nuclear sensitivo del trigémino, la distribución de CGRP en el cobaya se acerca más a la hallada en el gato que a la descrita en la rata, puesto que la presencia de inmunorreactividad de CGRP en el núcleo paratrigeminal ventral, en el núcleo oral ventral y en el núcleo principal ventral se halla, aunque en una moderada proporción, sólo en las dos primeras especies. Estos datos sugieren que el cobaya puede ser un modelo animal más adecuado que la rata para el estudio de la distribución de neuropéptidos en el sistema nervioso central, especialmente si se pretenden realizar extrapolaciones a vertebrados superiores incluyendo el hombre.

5.1.2. Sustancia P

Las secciones de tejido nervioso que fueron tratadas con el anticuerpo de abcam número ab14184 registraron una expresión excelente de la sustancia P en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y médula espinal cervical del cobaya. Sin embargo, ya sea porque en esta especie la sustancia P es más abundante que el CGRP, o porque el anticuerpo empleado presenta una posible reacción cruzada no conocida con otros neuropéptidos, hemos observado que la distribución de la sustancia P en estas regiones del sistema nervioso central del cobaya era más amplia que la registrada en otros trabajos (Seybold y Elde, 1980; Kawata *et al.*, 1989; Knyihár-Csillik *et al.*, 1990; Marlier *et al.*, 1990; Sugimoto *et al.*, 1997a).

En el *núcleo caudal del trigémino* y *médula espinal cervical* del cobaya hemos hallado, como Gallagher *et al.* (1992), que la zona de máxima proyección de fibras sustancia P positivas se localiza en las láminas I y IIo de Rexed, de modo análogo a lo registrado en la rata (Seybold y Elde, 1980; Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Knyihár-Csillik *et al.*, 1990; Marlier *et al.*, 1990; Sugimoto *et al.*, 1997a), en el mono (DiFiglia

et al., 1982) y en el cerdo (Kawata *et al.*, 1989). Las fibras sustancia P positivas, al igual que se comentó en relación con las fibras con inmunorreactividad de CGRP, también fueron identificadas en láminas más profundas del asta dorsal. En el cobaya así como en la rata (Seybold y Elde, 1980; Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Marlier *et al.*, 1990; Sugimoto *et al.*, 1997a) y en otros mamíferos (DiFiglia *et al.*, 1982; Kawata *et al.*, 1989) se han observado fibras sustancia P positivas en la lámina III y V de Rexed. Los territorios de proyección de fibras con sustancia P y CGRP en el asta dorsal medular y espinal son bastante coincidentes, pese a que en general, la sustancia P presenta una distribución más amplia que el CGRP. En este sentido, hemos observado que en el cobaya al igual que en la rata (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984) existen fibras con sustancia P, pero no con CGRP, en el núcleo espinal lateral. De modo análogo, en el cobaya hemos demostrado la existencia de sustancia P en fibras de la lámina V que carecían de CGRP. Los hallazgos obtenidos en cuanto al contenido de sustancia P en la lámina V de la rata son contradictorios entre los diferentes autores. Mientras que Wiesenfeld-Hallin *et al.* (1984) concluyen que las proyecciones sustancia P positivas a la lámina V son más numerosas que las proyecciones CGRP positivas, Sugimoto *et al.* (1997a) han observado lo contrario.

Analizando los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, también hemos observado diferencias entre el cobaya y rata en lo referente a la distribución de la sustancia P. Así, las ratas prácticamente no presentan ninguna proyección de sustancia P hacia el **núcleo principal del trigémino** (Sugimoto *et al.*, 1997a). Por el contrario, en el cobaya existe una expresión de sustancia P que se solapa con el campo de terminación de fibras con CGRP, fundamentalmente, en la región dorsolateral del núcleo principal dorsal.

En el **núcleo oral del trigémino** del cobaya y de la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a) las proyecciones con sustancia P se observaron en la misma localización donde se había observado la inmunorreactividad de CGRP, existiendo por tanto las mismas diferencias y similitudes entre ambas especies que fueron comentadas anteriormente en relación al CGRP.

La distribución de fibras con sustancia P en el **núcleo interpolar del trigémino** del cobaya fue notablemente distinta a la observada en la rata. En la rata la expresión de sustancia P se limitó casi de manera exclusiva a la división dorsal, y concretamente a su región más medial (Sugimoto *et al.*, 1997a). Por el contrario, las fibras sustancia P positivas en el cobaya se registraron en la región marginal de ambas divisiones del

núcleo interpolar, adyacente al tracto espinal trigeminal. En ambas especies se observó un solapamiento de las proyecciones con CGRP y sustancia P únicamente en el núcleo interpolar dorsal. En relación a los núcleos paratrigeminales, tanto en la rata como en el cobaya la distribución de las fibras con sustancia P fue la misma que la de las fibras con CGRP, es decir, la rata recibió una densa proyección de fibras con sustancia P únicamente en el núcleo paratrigeminal dorsal (Sugimoto *et al.*, 1997a), y el cobaya tanto en el núcleo paratrigeminal dorsal como en el ventral.

En resumen, la distribución de sustancia P en el complejo nuclear sensitivo del trigémino en el cobaya presenta unas diferencias con la rata de un modo bastante similar a lo observado para el CGRP, confirmando una vez más las notables diferencias bioquímicas y presumiblemente funcionales que pueden existir entre el sistema nervioso central de las dos especies.

5.2. Distribución central de las aferentes primarias trigeminales visualizadas con neurotrazadores

5.2.1. CTb-HRP

La distribución del precipitado en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y primer segmento cervical del cobaya se localizó aproximadamente en el área correspondiente a la región de las vibrisas vista en el gato (Nomura *et al.*, 1986) y en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983; Robertson y Arvidsson, 1985). Este territorio se incluye dentro de la representación de la rama infraorbitaria de la división maxilar del nervio trigémino (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986a,b).

En los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya, hemos observado el precipitado en toda su extensión rostrocaudal, desde el núcleo principal hasta el núcleo interpolar del trigémino. En el **núcleo principal** del cobaya las fibras fueron identificadas principalmente en la región ventrolateral, aunque algunas terminales también alcanzaron la zona medial. Esta misma distribución del precipitado, salvo pequeñas diferencias, existe en el gato (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b) y en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983). En este sentido, se han observado terminales en el borde dorsolateral del núcleo principal rostral del gato (Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986), o en toda la extensión lateromedial del núcleo principal ventral caudal del gato (Nomura *et al.*, 1986) y de la rata (Jacquin y Rhoades, 1983). En el **núcleo oral** del cobaya hemos visto, al igual que en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983) y en el gato (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b), una distribución del precipitado principalmente en la región ventrolateral de dicho núcleo. La localización de las terminales del nervio infraorbital en el núcleo oral no presenta diferencias en sentido dorsoventral ni lateromedial entre las especies anteriormente citadas. Sin embargo, cabe destacar el estudio de Shigenaga *et al.* (1986b), quienes no registraron ningún precipitado en el núcleo oral rostral, a diferencia de los demás investigadores que observaron una distribución continua del mismo en toda la extensión rostrocaudal. En el **núcleo interpolar** del cobaya y de las otras especies (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b), las proyecciones se han registrado fundamentalmente en la zona media del núcleo. A

diferencia del cobaya donde la distribución de terminales es homogénea en toda la extensión rostrocaudal de los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983) y en el gato (Marfurt, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b) la mayor densidad de precipitado se concentra en el núcleo principal ventral y en el núcleo interpolar. Esta diferencia ha permitido observar cómo las terminaciones centrales de las fibras que inervan las vibrisas replican la organización periférica de éstas en ambos núcleos (Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986). Por otra parte, y fuera de los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, en el cobaya se ha observado precipitado en los núcleos paratrigeminales dorsal y ventral, que no ha sido descrito en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983) ni en el gato (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b).

En el *núcleo caudal* del cobaya, del gato (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986a) y de la rata (Jacquin y Rhoades, 1983) el producto de reacción se ha registrado en las láminas I-V de Rexed. En los *dos tercios rostrales del núcleo caudal*, los diferentes autores confirman la existencia de un precipitado más intenso y con una distribución más amplia en las láminas superficiales (I-II) que en las profundas (III-V). Sin embargo, cabe destacar dos diferencias en relación a la localización y distribución del precipitado en las láminas superficiales. Por una parte, el producto de reacción en la lámina II del cobaya se localiza en la sublámina Ilo de la misma forma que ha sido descrito en la rata (Jacquin y Rhoades, 1983), mientras que en el gato algunos autores lo han identificado en la sublámina Ili (Nomura *et al.*, 1986) y otros en ambas subláminas (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Shigenaga *et al.*, 1986a). Por otra parte, nosotros hemos visto terminales en toda la extensión lateromedial de las láminas superficiales del cobaya, mientras que en los restantes estudios como máximo el producto de reacción se limita a las tres cuartas partes laterales de dichas láminas (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986a). En relación con el *tercio final del núcleo caudal* y el *tercio rostral de CI*, en el cobaya así como en el gato (Panneton y Burton, 1981; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986a), el producto de reacción en las láminas superficiales y en las profundas se restringe únicamente a la zona media.

Fibras mielinizadas de gran diámetro que inervan la región de las vibrisas de gatos y ratas proyectan fundamentalmente a las láminas III-V (Hayashi, 1985a,b;

Robertson y Arvidsson, 1985). Por el contrario, las láminas I y II reciben principalmente axones mielinizados de pequeño diámetro y la lámina III fibras amielínicas de tipo C (Light y Perl, 1979a,b; Brown, 1981). Teniendo en cuenta que la CTb-HRP se une selectivamente al receptor de membrana gangliósido GM₁, que está presente en neuronas con axones mielinizados, la amplia distribución del precipitado que hemos observado en el núcleo caudal del cobaya se relaciona con el tipo de fibras que proyectan al núcleo caudal de otros mamíferos. Por otra parte, conviene resaltar que esta amplia representación del conjugado CTb-HRP en las láminas I-II y en menor medida en la lámina III a lo largo de los dos tercios rostrales del núcleo caudal, se solapa con el territorio donde hemos registrado c-fos tras la estimulación nociceptiva periférica.

5.2.2. IB4-HRP

Clásicamente, la IB4 se ha considerado un marcador de nociceptores no peptidérgicos principalmente de tipo amielínico, es decir, de fibras tipo C (Silverman y Kruger, 1988; Ambalavanar y Morris, 1993; Kobayashi y Matsumura, 1996). Sin embargo, a raíz del gran solapamiento hallado recientemente entre neuronas peptidérgica y neuronas que también expresaban lugares de unión para la IB4, se ha puesto en entredicho la utilidad de esta lectina para discernir entre ambos tipos de nociceptores (Price y Flores, 2007).

En el cobaya, sólo hemos visto positividad para el conjugado IB4-HRP en las láminas I y II, y algo en lámina III, del tercio final del núcleo caudal aproximadamente en la misma localización en la que se identificó el precipitado producido por el transporte del conjugado WGA-HRP. Esta localización exclusiva en la región del núcleo caudal del trigémino es también lo que han hallado Kobayashi y Matsumura (1996) cuando aplicaron este conjugado en varias áreas orofaciales de la rata. Por el contrario, cuando se inyectó directamente IB4-HRP en el ganglio de Gasser de la rata, además del núcleo caudal del trigémino, también se observó precipitado en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino y en el núcleo paratrigeminal dorsal (Sugimoto *et al.*, 1997b). La presencia de precipitado en las zonas rostrales trigeminales de la rata pero no del cobaya puede ser atribuible a que el trazador fue

inyectado en el ganglio trigeminal, mientras que nosotros únicamente marcamos fibras que inervan la región de las vibrisas.

La ausencia de producto de reacción en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, significa que la posible positividad de c-fos a este nivel si fuera debida a fibras primarias procedentes de las vibrisas o bien serían fibras de tipo mielínico de pequeño calibre (tipo A δ) y por tanto positivas para el conjugado CTb-HRP o bien serían fibras de tipo amielínico pero que carecen del receptor para la IB4.

5.2.3. WGA-HRP

El conjugado WGA-HRP presenta una gran afinidad por el receptor de membrana N-acetil-glucosamina. A diferencia del gangliósido GM₁, el receptor N-acetil-glucosamina está presente en las neuronas primarias de todos los tamaños (Robertson y Arvidsson, 1985), por lo que cabría esperar obtener una representación más amplia que con el conjugado CTb-HRP. Sin embargo, en el cobaya sólo hemos visto el precipitado de manera apreciable producido por el transporte del conjugado WGA-HRP en las láminas I y II del tercio final del núcleo caudal del trigémino. Las láminas más profundas del asta dorsal medular, los núcleos paratrigeminales así como los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino no presentaron ningún producto de reacción. La menor efectividad del conjugado WGA-HRP frente al conjugado CTb-HRP en nuestro trabajo está en línea con el estudio llevado a cabo por Segade *et al.* (1991). Se demuestra que, al menos en el sistema trigeminal, el conjugado CTb-HRP es mejor trazador que el conjugado WGA-HRP para estudios de transporte transganglionar, con la excepción del marcaje registrado en las láminas superficiales.

5.3. Expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y estructuras relacionadas

5.3.1. Núcleo caudal

La expresión de c-fos en el núcleo caudal del trigémino y en el asta dorsal de C1 en nuestro estudio experimental en el cobaya supone una evidencia más de lo que se ha hallado en otras investigaciones realizadas en mamíferos, en los que también se ha observado inmunorreactividad para c-fos en el núcleo caudal del trigémino y en el asta dorsal de C1 después de la aplicación de un estímulo de naturaleza nociceptiva en la región orofacial (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; Byers *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2002). Todas estas experiencias basadas en la expresión de c-fos reafirman el papel fundamental en el procesamiento central del dolor orofacial por el núcleo caudal del trigémino y astas dorsales de los segmentos más rostrales de la médula cervical espinal. Así pues, estos hallazgos explican las analgesias producidas por las tractotomías trigeminales experimentales (Azerad y Woda, 1976; Greenwood y Sessle, 1976; Vyklicky *et al.*, 1977; Nord y Young, 1979; Young y Perryman, 1984; Dallel *et al.*, 1988, 1989) y clínicas (Sjöqvist, 1938, Weinberger y Grant, 1942; Hamby *et al.*, 1948). De la misma forma, estos estudios de c-fos avalan los resultados obtenidos en animales mediante experimentos electrofisiológicos, en los que se registró, después de una estimulación nociceptiva en campos orofaciales, una actividad neuronal en el núcleo caudal de ratas (Shigenaga *et al.*, 1976; Dallel *et al.*, 1988), de gatos (Hu *et al.*, 1981; Hu y Sessle, 1984) y de monos (Price *et al.*, 1976; Maixner *et al.*, 1986, 1989; Dubner *et al.*, 1989).

El núcleo caudal del trigémino y el asta dorsal de C1 intervienen en la codificación de los impulsos nociceptivos procedentes de estructuras intraorales, tal y como se comprueba por la expresión de c-fos observada tras una estimulación lingual (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; He *et al.*, 2000),

dentaria (Coimbra y Coimbra, 1994; Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998b; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000) y mucosa oral (Segade *et al.*, 1992; Sugimoto *et al.*, 1994). Además, los resultados de nuestro estudio en el cobaya también confirman que, como consecuencia de estímulos nociceptivos en áreas craneales extraorales, existe activación neuronal en el asta dorsal medular (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Sugimoto *et al.*, 1998a; Nomura *et al.*, 2002) y espinal (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Nomura *et al.*, 2002). De manera análoga a la estimulación que nosotros hemos hecho en nuestras experiencias, en otras investigaciones la estimulación facial fue realizada en la región de las vibrisas (Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Nomura *et al.*, 2002), mientras que en los restantes casos el estímulo fue aplicado en la córnea (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Sugimoto *et al.*, 1998a) y en el labio (Strassman y Vos, 1993; Wang *et al.*, 1994; Hermanson y Blomqvist, 1997), así como en otras localizaciones craneales extraorales (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Hathaway *et al.*, 1995; Dutschmann y Herbert, 1997).

La localización de las neuronas con expresión de c-fos que hemos observado en el núcleo caudal del trigémino y asta dorsal de C1 del cobaya es muy similar a la descrita en la rata después de una estimulación nociceptiva de la región de las vibrisas (Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995). En ambas especies, la gran mayoría de los núcleos c-fos positivos se hallan en la porción media de las astas dorsales medular y de C1. Esta distribución topográfica de la inmunorreactividad de c-fos en el cobaya y en la rata se solapa en gran medida con el territorio de proyección central de las aferentes primarias procedentes del nervio infraorbitario (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986a,b), y más concretamente con el área terminal de las fibras que inervan la región de las vibrisas de la rata (Jacquin y Rhoades, 1983; Robertson y Arvidsson, 1985; Nomura *et al.*, 1986) y del cobaya,

como queda puesto de manifiesto con los neurotrazadores transganglionares empleados en nuestra investigación.

Nosotros hemos observado que diversos irritantes químicos son capaces de producir expresión de c-fos en el núcleo caudal del trigémino y en el asta dorsal de C1 del cobaya. Esta expresión de c-fos, inducida mediante una estimulación nociceptiva química en el área orofacial, también se ha descrito en la rata (Segade *et al.*, 1992; Strassman y Vos, 1993; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Bereiter *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2002), en el gato (Bereiter *et al.*, 1994; Iwata *et al.*, 1998) y en el hurón (Chattipakorn *et al.*, 2002, 2005). En algunas de estas investigaciones se han empleado las mismas sustancias irritantes con las que nosotros hemos hecho la estimulación en el cobaya, es decir, el aceite de mostaza (Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2002), la formalina (Wang *et al.*, 1994; Mineta *et al.*, 1995; Hermanson y Blomqvist, 1997; He *et al.*, 2000) y la capsaicina (Strassman y Vos, 1993; Carstens *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; He *et al.*, 2000). Por el contrario, en los restantes estudios se han empleado otras sustancias tales como el ácido acético (Segade *et al.*, 1992), el cloruro cálcico (Chattipakorn *et al.*, 2005), y la histamina (Carstens *et al.*, 1995), entre otras (Carstens *et al.*, 1995; Chattipakorn *et al.*, 2002). Al margen de los estímulos químicos, en el gato (Iwata *et al.*, 1998), en el hurón (Oakden y Boissonade, 1998; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2005) y en la rata (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Vos y Strassman, 1995; Aihara *et al.*, 1999; Meng y Bereiter, 1996; Dutschmann y Herbert, 1997; Aihara *et al.*, 1999; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000), también se ha registrado inmunorreactividad de c-fos en el asta dorsal medular y espinal como consecuencia de estímulos de otra naturaleza, como son los estímulos mecánicos nocivos (Strassman y Vos, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Vos y Strassman, 1995; Aihara *et al.*, 1999; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2002), los estímulos térmicos (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Meng y Bereiter, 1996; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2005) y la estimulación eléctrica, entre otros (Allen *et al.*, 1996; Dutschmann y Herbert, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000). Así pues, se comprueba

que la inmunorreactividad de c-fos en el núcleo caudal del trigémino y en C1 puede inducirse con una gran variedad de estímulos nociceptivos, lo que conduce a preguntarnos cuál de ellos es el más efectivo a la hora de promover una mayor expresión de c-fos. En este sentido, nosotros hemos comprobado que en el cobaya el aceite de mostaza es capaz de activar significativamente más neuronas que la capsaicina y la formalina en el asta dorsal medular y espinal. De la misma forma, Iwata *et al.* (1998) demostraron en el gato que la estimulación pulpar con aceite de mostaza excitaba más neuronas que la estimulación eléctrica en el núcleo caudal del trigémino y en C1. Sin embargo, Meng y Bereiter (1996) hallaron más neuronas c-fos positivas en el límite entre el núcleo caudal del trigémino y C1 después de la aplicación de estímulos térmicos nocivos a la córnea que con la administración de aceite de mostaza.

Nosotros hemos hallado en el cobaya que, la aplicación de un estímulo periférico en la región orofacial induce expresión de c-fos bilateral, pero con predominio ipsilateral significativo, en el núcleo caudal del trigémino y en el asta dorsal de C1, de manera análoga a lo que se ha descrito en otros mamíferos (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000). Esta diferencia se explica porque la proyección de fibras aferentes primarias en estos centros de segundo orden es fundamentalmente de tipo ipsilateral, siendo muy pocas las fibras que cruzan la línea media para establecer sinapsis en el lado contralateral (Jacquin *et al.*, 1990; Segade *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991).

Atendiendo a la distribución laminar, nosotros, así como la mayoría de otros estudios, hemos hallado expresión de c-fos tras la aplicación de un estímulo nocivo en las láminas superficiales (I-II) del núcleo caudal y de C1 (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Allen *et al.*, 1996; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999; Byers *et al.*, 2000;

Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Takemura *et al.*, 2000a,b, 2001), y más concretamente en las láminas I y II (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997). La mayor inmunorreactividad presente en estas láminas confirma los resultados de estudios electrofisiológicos en los que las neuronas nociceptivas específicas eran halladas principalmente en las láminas I y II del asta dorsal medular y espinal (Mosso y Kruger, 1973; Price y Mayer, 1974, 1975; Willis *et al.*, 1974; Handwerker *et al.*, 1975; Yokota, 1975; Price *et al.*, 1976; Yokota *et al.*, 1979, 1981; Hu y Sessle, 1984). Igualmente corrobora resultados de investigaciones inmunohistoquímicas encaminadas a la detección de péptidos nociceptivos tales como CGRP y sustancia P, cuya presencia se ha observado principalmente en las láminas superficiales del núcleo caudal y asta dorsal de la médula espinal (Seybold y Elde, 1980; DiFiglia *et al.*, 1982; Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1984; Carlton *et al.*, 1988; Conrath *et al.*, 1989; Kawata *et al.*, 1989; Knyihár-Csillik *et al.*, 1990; Marlier *et al.*, 1990; Merighi *et al.*, 1990; Gallagher *et al.*, 1992; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a).

Al margen de las láminas I y II del núcleo caudal y médula espinal, la inmunorreactividad de c-fos también se ha visto en láminas más profundas. En línea con los hallazgos de otras investigaciones (Strassman y Vos 1993; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Fujiyoshi *et al.*, 2000; Chattipakorn *et al.*, 2002), nosotros hemos observado expresión de c-fos en la lámina III del asta dorsal medular y espinal. La localización de las neuronas c-fos positivas en esta lámina se solapa en gran parte con los lugares donde hemos visto proyección de fibras con inmunorreactividad para CGRP. Por otra parte, de manera análoga a las investigaciones en las que se ha realizado una estimulación principalmente de naturaleza química, ya sea en la ATM (Hathaway *et al.*, 1995), en la región de las vibrisas (Strassman y Vos, 1993; Mineta *et al.*, 1995) o en el labio (Segade *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994), nosotros también hemos observado expresión de c-fos en la lámina V del núcleo caudal y C1 del cobaya tras la estimulación de la región de las vibrisas. La ubicación de neuronas c-fos positivas en la lámina V corrobora hallazgos de estudios electrofisiológicos, que sitúan a este nivel principalmente neuronas nociceptivas de límite vasto y dinámico (Mosso y Kruger, 1973; Price *et al.*, 1976; Dubner y Bennet, 1983; Hu y Sessle, 1984; Sessle, 1987).

Los estudios que han analizado la expresión de c-fos en el núcleo caudal y en C1 en su conjunto y atendiendo a criterios cuantitativos son escasos. El número total de neuronas del núcleo caudal y de C1 del cobaya que fueron activadas por la inyección del aceite de mostaza en la región de las vibrisas fue mayor que el observado tras la estimulación eléctrica dentaria (Allen *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998; Oakden y Boissonade, 1998), la estimulación de la mucosa labial con ácido acético (Segade *et al.*, 1992), la estimulación mecánica dañina de la región de las vibrisas (Vos y Strassman, 1995), la estimulación eléctrica del ganglio de Gasser (Takemura *et al.*, 2000a) y la estimulación pulpar con capsaicina (Allen *et al.*, 1996) o aceite de mostaza (Iwata *et al.*, 1998). Como se comentó anteriormente, nosotros y el resto de los investigadores observamos que la mayor parte de las neuronas del asta dorsal y espinal que expresaron c-fos se localizaron en las láminas superficiales. Sin embargo, la proporción de neuronas con inmunoreactividad de c-fos identificadas en el núcleo caudal y C1 que se situaron en las láminas I-II varió ostensiblemente entre los distintos estudios. Así pues, las neuronas c-fos positivas del núcleo caudal y C1 situadas en las láminas superficiales supusieron desde un 95-97% (Segade *et al.*, 1992; Takemura *et al.*, 2000a) del total de neuronas que respondieron al estímulo nociceptivo, hasta sólo un 64% (Iwata *et al.*, 1998), pasando por un 80-89% observado en nuestro estudio.

El agonista del sistema GABA_B baclofeno inhibió significativamente la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza, de un modo análogo a lo observado por Takemura *et al.* (2001). Estudios neuroanatómicos han demostrado que existen receptores de GABA_B pre- y postsinápticos en las aferentes primarias y en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (Price *et al.*, 1984, 1987; Margeta-Mitrovic *et al.*, 1999); además, también se ha demostrado que estos receptores existen en las neuronas ganglionares de pequeño tamaño del ganglio del trigémino (Takeda *et al.*, 2004), que son las que emiten aferentes primarias de pequeño diámetro constituidas por fibras A δ y C. Por ello, la activación de los receptores de GABA_B produce una disminución de la excitabilidad de estas neuronas trigeminales de pequeño tamaño y en consecuencia ello afectaría a la activación monosináptica de las neuronas de segundo orden situadas en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y en el asta dorsal de C1. Además, también se podría efectuar la inhibición por circuitos internos en las láminas superficiales del asta dorsal del núcleo caudal del trigémino y de C1, debido a la existencia de receptores postsinápticos a las aferentes primarias trigeminales (Margeta-Mitrovic *et al.*, 1999). Naturalmente, la inhibición de las neuronas de segundo

orden producirá una disminución de las neuronas activadas polisinápticamente y, por lo tanto, ello conllevará una menor expresión de c-fos en todas aquellas áreas de proyección de estas neuronas de segundo orden trigeminales, como pueden ser la formación reticular, regiones rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino, el complejo parabraquial, etc. En nuestro estudio con neurotrazadores inyectados en la región central de las vibrisas sólo hemos podido demostrar la existencia de aferentes primarias amielínicas no peptidérgicas en el tercio final del núcleo caudal del trigémino, lo que significa que, puesto que pensamos que el baclofeno ejerce su efecto inhibitorio sobre la amplia representación central de las vibrisas en las láminas superficiales y profundas en toda la extensión del núcleo caudal del trigémino y regiones rostrales de C1, esta inhibición en su mayor parte estaría ejercida sobre aferentes primarias de tipo A δ que terminarían en las láminas I-IIo y V.

De modo distinto a lo observado con el baclofeno, el faclofeno no ejerció ningún efecto significativo sobre la expresión de c-fos hallada en el núcleo caudal y en C1 del cobaya, lo que difiere de lo hallado por Takemura *et al.* (2001) en la rata. Esta discrepancia en el efecto del antagonista del sistema GABA_B podría deberse a diferencias puramente interespecíficas. De hecho, sabemos que el cobaya y la rata presentan una distribución distinta en el sistema nervioso central de diversos neuropéptidos tales como el CGRP (Réthelyi *et al.*, 1989b) y la sustancia P (Gallagher *et al.*, 1992), de la misma forma que conocemos que en el complejo ventrobasal talámico del cobaya existen interneuronas GABAérgicas (Spreafico *et al.*, 1994; Arcelli *et al.*, 1997) que no están presentes en la rata (Arcelli *et al.*, 1997). Sin embargo, también cabría preguntarse si la diferencia en la expresión de c-fos hallada entre ambas especies podría ser atribuible al tipo de estímulo nociceptivo aplicado. El aceite de mostaza activa fundamentalmente nociceptores amielínicos o mielinizados de pequeño calibre (Reeh *et al.*, 1986; Woolf y Wall, 1986; Fitzgerald, 1987; Harris y Ryall, 1988; Story *et al.*, 2003), mientras que, la estimulación eléctrica de baja intensidad únicamente excita fibras A pero no fibras C. En cambio, la estimulación eléctrica de alta intensidad además de activar nociceptores de pequeño calibre (fibras C) también activa fibras de mayor diámetro (Woolf y Wall, 1982; Nishimori *et al.*, 1990). Por lo tanto, habría que demostrar que nuestra estimulación química con aceite de mostaza es totalmente equiparable a la estimulación eléctrica de umbral alto, para tener una valoración adecuado de los distintos tipos de estimulación.

5.3.2. Núcleo interpolar

Los resultados de nuestro estudio en el cobaya confirman que la expresión de c-fos en el núcleo interpolar del trigémino después de una estimulación nociceptiva periférica se concentra fundamentalmente en el tercio caudal del mismo (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005). La distribución rostrocaudal de la inmunorreactividad de c-fos en el núcleo interpolar no ha sido analizada en ninguna de estas investigaciones desde un punto de vista cuantitativo. Nosotros hemos observado que el 55% de las neuronas c-fos positivas se localizaron en el tercio caudal del núcleo interpolar. Por otra parte, y a diferencia de estas mismas investigaciones, nosotros como Strassman y Vos (1993) también hemos hallado algunas neuronas c-fos positivas en la mitad rostral del núcleo interpolar. Esta preponderancia caudal de la expresión de c-fos se corresponde con la mayor presencia de terminales de fibras con inmunorreactividad de CGRP en los niveles caudales que en los niveles rostrales del núcleo interpolar (Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Boissonade *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a).

En el cobaya hemos visto expresión de c-fos fundamentalmente en las regiones ventromedial y ventrolateral del núcleo interpolar ventral después de inyectar un irritante químico en la región de las vibrisas. Esta localización de las neuronas c-fos positivas coincide en parte con el área terminal de las vibrisas visualizada con CTb-HRP en nuestro estudio, y con estudios anatómicos previos acerca de la distribución central de aferentes primarias infraorbitarias en dicho núcleo (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Nomura *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986b). Igualmente, neuronas del núcleo interpolar activadas por estimulación nociceptiva periférica e identificadas electrofisiológicamente fueron registradas en estas zonas (Azerad *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1984). Por tanto, es muy probable que la mayoría de las células del núcleo interpolar con expresión de c-fos fueran activadas por entradas infraorbitarias monosinápticas.

La expresión de c-fos observada en el núcleo interpolar del cobaya fue significativamente mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral, aunque conviene resaltar la moderada expresión bilateral que hemos observado. Actualmente se desconoce el significado funcional de la inmunorreactividad de c-fos contralateral. Sin

embargo, diversos estudios han mostrado que los estímulos nocivos producen un modelo bilateral de expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino (Lu *et al.*, 1993; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002); por ejemplo, la inflamación pulpar se ha visto que produce expresión bilateral de c-fos en la transición de los núcleos interpolar y caudal del trigémino (Chattipakorn *et al.*, 2002). Hoy en día sabemos que existen tractos neuroanatómicos que podrían explicar la expresión bilateral de c-fos dentro del complejo nuclear sensitivo del trigémino. Así, estudios con neurotrazadores han identificado proyecciones directas de aferentes trigeminales a regiones trigeminales contralaterales (Jacquin *et al.*, 1990; Segade *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991), además de aquellas conexiones comisurales (Jacquin *et al.*, 1990). La expresión de c-fos contralateral observada en ésta y en otras investigaciones podría ser una explicación al dolor referido que a menudo alcanza estructuras situadas más allá de la línea media orofacial.

Las observaciones de nuestro trabajo junto con los estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos previamente citados sostienen que la región caudal del núcleo interpolar es un centro importante para el procesamiento de la información nociceptiva. El núcleo interpolar proyecta al tálamo (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987), al cerebelo (Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987), al complejo parabraquial (Panneton *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1997), además de a otras regiones del sistema nervioso central (Ruggiero *et al.*, 1981; Steindler, 1985; Bruce *et al.*, 1987). Para obtener un mayor conocimiento acerca de los aspectos funcionales de este núcleo, sería interesante saber si todos estos lugares de proyección, o en especial alguno de ellos, reciben entradas desde las neuronas del núcleo interpolar que expresan c-fos tras una estimulación nociceptiva. En este sentido, Allen *et al.* (1996) realizaron un estudio de doble marcaje a nivel del núcleo espinal trigeminal y encontraron una importante población de neuronas c-fos positivas del núcleo interpolar que proyectaban al núcleo parabraquial lateral, región supraspinal que se sabe está implicada en la nocicepción (Bernard y Besson, 1990; Hermanson y Blomqvist, 1996, 1997; Dutschmann y Herbert, 1997).

Nosotros hemos hallado un valor medio de 197 neuronas c-fos positivas en el núcleo interpolar ipsilateral tras la inyección de aceite de mostaza en la región de las vibrisas. El número de neuronas activadas por este irritante químico es mayor que el registrado por Takemura *et al.* (2000a) después de hacer una estimulación eléctrica del ganglio trigeminal, pero inferior al observado por Segade *et al.* (1992) tras inyectar ácido acético en la mucosa labial. El número de neuronas con expresión de c-fos

observadas en el núcleo interpolar del cobaya tras la estimulación con aceite de mostaza es aproximadamente un 7% de las neuronas activadas en el núcleo caudal y C1 tras la inyección de este irritante químico. Esta proporción es inferior a la observada en otros estudios en los que los porcentajes variaban de un 10,3% (Takemura *et al.*, 2000a) a un 34% (Segade *et al.*, 1992).

A diferencia del núcleo caudal para el que se han realizado estudios en los que se compara la expresión de c-fos tras la aplicación de distintos irritantes químicos (Meng y Bereiter, 1996; Iwata *et al.*, 1998, Nomura *et al.*, 2002), no existe ninguna investigación que haya analizado la expresión de c-fos en el núcleo interpolar asociada a estímulos de diferente naturaleza. Nosotros en nuestra investigación no hemos hallado diferencias significativas entre los tres irritantes utilizados en la leve expresión de c-fos hallada en el núcleo interpolar dorsal. Por el contrario, el aceite de mostaza indujo más inmunoreactividad de c-fos que la formalina en el núcleo interpolar ventral y en la formación reticular adyacente, y estadísticamente también más que la capsaicina en la formación reticular.

En línea con los resultados del estudio de Takemura *et al.* (2001) en la rata, hemos observado que en el cobaya el baclofeno inhibe la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza en el núcleo interpolar así como en la formación reticular ventral adyacente. Por el contrario, el baclofeno no presenta un efecto uniforme en dichas regiones del sistema nervioso central. En el núcleo interpolar ventral, este antagonista del sistema GABA_B aumentó significativamente la expresión de c-fos en el núcleo interpolar ventral, mientras que en el núcleo interpolar dorsal y en la formación reticular ventral adyacente no se observó ningún efecto con respecto a cuando únicamente se hizo la estimulación. Estos resultados, sumados a lo que hemos hallado en otras agrupaciones del tallo nervioso, demuestran que en conjunto el baclofeno no aumenta de modo significativo el número de neuronas activadas en el bulbo raquídeo por estímulos nociceptivos aplicados a la región de las vibrisas. Sin embargo, la disminución significativa en la expresión de c-fos en el núcleo interpolar y formación reticular adyacente, provocada por la administración previa de baclofeno, muestra que la codificación del dolor facial en estos núcleos está mediada por el sistema GABA_B, al menos en lo que se refiere a una regulación inhibitoria mediante vías monosinápticas o polisinápticas.

5.3.3. Núcleos paratrigeminales

Nosotros hemos observado en el cobaya una apreciable expresión de c-fos con distribución bilateral en el denominado núcleo paratrigeminal. En la literatura, el núcleo paratrigeminal se ha homologado con un grupo de neuronas con una localización difusa dentro de las fibras descendentes del tracto espinal del trigémino a nivel del núcleo interpolar y de la región rostral del núcleo caudal. Estos grupos difusos neuronales también se conocen como núcleo intersticial del trigémino o islas intersticiales del trigémino de Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1911; Albe-Fessard *et al.*, 1975; Gobel *et al.*, 1977; Phelan y Falls, 1989b). El núcleo paratrigeminal se ha reconocido en el conejo (Ramón y Cajal, 1911), en la rata (Chan-Palay, 1978a,b; Panneton y Burton, 1985; Phelan y Falls, 1989b; Saxon y Hopkins, 1998), en el gato (Hayashi y Tabata, 1989a; Light, 1992), en el mono y en el hombre (Chan-Palay, 1978a,b). Experimentos electrofisiológicos, estudios neuroanatómicos e histoquímicos sugieren que esta formación neuronal puede considerarse como una expansión rostral de la lámina I del núcleo caudal del trigémino. Los estudios electrofisiológicos (Hayashi y Tabata, 1989a,b) hallaron que, como se ha observado en las neuronas de la lámina I del núcleo caudal del trigémino, todas las neuronas registradas respondieron a estímulos nociceptivos. Por otro lado, se ha demostrado con neurotrazadores (Panneton y Burton, 1985; Altschuler *et al.*, 1989; Panneton *et al.*, 1994; Saxon y Hopkins, 1998; Pinto *et al.*, 2006) que las células paratrigeminales proyectan rostralmente al complejo parabraquial, principalmente en aquellos subnúcleos implicados en la recepción del dolor, como son el núcleo lateral medial y el núcleo lateral externo (Bernard y Besson, 1990; Hermanson y Blomqvist, 1997). Las pruebas histoquímicas son las que, sin duda, sustentan más la hipótesis de que los núcleos paratrigeminales y la zona marginal caudal del núcleo interpolar constituyen una expansión rostral de la lámina I del núcleo caudal del trigémino. Así, la distribución de CGRP descrita en la rata (Sugimoto *et al.*, 1997a), en el gato (Henry *et al.*, 1996) y la observada por nosotros en nuestro estudio en el cobaya muestra que existe una densa red de terminales sobre las islas intersticiales del núcleo paratrigeminal y en la región marginal adyacente del núcleo interpolar; además, esta red se continúa caudalmente con las láminas superficiales del núcleo caudal del trigémino. Por otro lado, estas mismas áreas contienen una red similar de fibras y terminales con sustancia P y también son positivas para un marcador de fibras

nociceptivas de tipo C, como es la FRAP (fosfatasa ácida fluoruro resistente) (Knyihár y Csillik, 1977).

Todo lo mencionado en el párrafo precedente nos señala que si fibras aferentes primarias procedentes de un territorio trigeminal periférico proyectan a esta región paratrigeminal, con toda probabilidad serían fibras que llevarían información nociceptiva orofacial. Por ello, en principio, se entendería como un resultado previsible que nosotros hallásemos expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal del cobaya como consecuencia de la aplicación de un irritante químico en la región subcutánea de las vibrisas. Conviene precisar, no obstante, que cuando se han empleado trazadores neuroanatómicos se comprobó que aquellos nervios a los que correspondía un territorio somático profundo, como las cavidades nasal y oral, eran los que estaban principalmente representados en el núcleo paratrigeminal, tanto a nivel dorsal como a nivel ventral. Así, el denominado núcleo paratrigeminal dorsal sería un territorio terminal de fibras procedentes de la rama mandibular del trigémino. Dentro de los nervios de esta rama mandibular, se ha hallado una intensa proyección de aferentes primarias de los nervios lingual, bucal y alveolar inferior, pero no de aquellos nervios con representación típicamente cutánea, como son el auriculotemporal y el milohioideo (Jacquin *et al.*, 1983; Shigenaga *et al.*, 1986a,b; Takemura *et al.*, 1987; Segade *et al.*, 1990). Por otro lado, en el denominado núcleo paratrigeminal ventral habría terminales procedentes de nervios profundos de las ramas maxilar y oftálmica, como son el etmoidal, el esfenopalatino o los nervios de la córnea (Shigenaga *et al.*, 1986a,b; Marfurt y Del Toro, 1987; Panneton, 1991). De acuerdo con estas observaciones, resulta lógico que se haya encontrado expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal después de una estimulación eléctrica de alta intensidad de estos nervios (Sugimoto *et al.*, 1998a) o de una estimulación nociceptiva en los territorios periféricos donde proyectan (Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Dutschmann y Herbert, 1997; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2005; Byers *et al.*, 2000; Boucher *et al.*, 2003). En aquellos estudios realizados en la rata en los que se estimuló el nervio infraorbitario (Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1998a) o la región de las vibrisas (Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995) no se ha descrito la presencia de inmunorreactividad de c-fos en ninguna de las agrupaciones paratrigeminales, es decir, el núcleo dorsal o el núcleo ventral (nosotros tampoco hemos hallado expresión de c-fos en nuestras ratas control); además, los estudios neuroanatómicos realizados en la rata no

demuestran que las aferentes primarias procedentes de la región de las vibrisas (Arvidsson, 1986) o de las ramas del nervio infraorbitario que allí terminan (Jacquin y Rhoades, 1983, 1985; Rhoades *et al.*, 1989) tengan una proyección central en la región paratrigeminal. Así pues, la ausencia de expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal de la rata después de aplicar un estímulo dañino en la región subcutánea de las vibrisas puede entenderse como normal, puesto que estaba admitido que las regiones faciales cutáneas no estaban aquí representadas. En contraste con lo mencionado en los párrafos anteriores, nosotros hemos comprobado que la aplicación de diversos irritantes químicos en la región subcutánea de las vibrisas del cobaya produce, a diferencia con la rata, expresión de c-fos en los núcleos paratrigeminales. Además, también hemos observado que con el trazador CTb-HRP existe una moderada proyección hacia la región paratrigeminal, la cual no ha podido hallarse con el trazador IB4-HRP. Esto significa que las fibras de las vibrisas del cobaya que proyectan hacia este núcleo son probablemente de tipo A δ , como lo son muchas de las que pueden hallarse en las láminas más superficiales del núcleo caudal del trigémino. Estos datos apoyan la hipótesis de que la expresión de c-fos observada en el núcleo paratrigeminal del cobaya ha sido inducida, al menos en parte, por aferentes primarias trigeminales procedentes de las vibrisas. Conviene precisar que en el gato el transporte transganglionar de neurotrazadores también ha permitido visualizar terminales infraorbitarias en los núcleos paratrigeminales, sobre todo en el ventral (Shigenaga *et al.*, 1986a), y ello supone una afinidad más con el cobaya; no obstante, puesto que no existen estudios en el gato sobre la expresión de c-fos en el tallo nervioso después de estimular la región de las vibrisas, no puede concluirse que en este animal los resultados vayan a ser similares a los hallados por nosotros en el cobaya.

Aunque hemos hallado expresión de c-fos en las dos agrupaciones paratrigeminales, dorsal y ventral, del cobaya, el mayor número de núcleos positivos se localizan significativamente en el núcleo ventral, territorio donde se han situado fibras terminales del nervio infraorbitario (Shigenaga *et al.*, 1986a). Esto significa una vez más que la distribución de c-fos en el núcleo paratrigeminal guarda una relación con la representación central somatotópica de los territorios periféricos trigeminales; de hecho cuando se ha descrito en la bibliografía la expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal dorsal, el estímulo nociceptivo se había aplicado en territorios propios de la rama mandibular del trigémino que proyectan a dicho núcleo (Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996). De todas formas, no todos los núcleos c-fos

positivos pueden atribuirse a una activación directa por fibras primarias trigeminales procedentes de las vibrisas, y una prueba de ello es la expresión bilateral de c-fos observada en nuestro estudio. Los núcleos positivos observados en el núcleo contralateral paratrigeminal no pueden deberse a aferentes primarias de las vibrisas, puesto que éstas exclusivamente se arborizan en los núcleos paratrigeminales ipsilaterales. La activación de los núcleos paratrigeminales contralaterales podría deberse en todo caso a la existencia, como en la rata, de fibras comisurales (Jacquin *et al.*, 1990).

A diferencia de lo hallado en otras regiones del complejo nuclear sensitivo del trigémino, como el núcleo caudal o el núcleo oral, la expresión de c-fos que hemos observado en el núcleo paratrigeminal presenta un carácter bilateral más acusado, aunque existe una preponderancia ipsilateral estadísticamente significativa ($p=0,044$). Esta expresión bilateral con tendencia ipsilateral no ha sido observada de manera consistente por los distintos investigadores. Mientras que unos confirman nuestras observaciones (Sugimoto *et al.*, 1998a; Byers *et al.*, 2000), otros únicamente admiten que la expresión se halla limitada al núcleo paratrigeminal ipsilateral (Hathaway *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Chattipakorn *et al.*, 1999).

Las distintas investigaciones que han estudiado la expresión de c-fos en el núcleo paratrigeminal no abordan el análisis de ésta desde un punto de vista cuantitativo, por lo que no es posible establecer comparaciones con las observaciones de nuestro estudio. En cualquier caso, cabe señalar que tras la aplicación de los distintos irritantes químicos, en el núcleo paratrigeminal del cobaya y especialmente en el ventral, se ha activado un número considerable de neuronas (212-317 neuronas ipsilaterales) que, aún cuando es claramente inferior al registrado en el núcleo caudal (1240-4171 neuronas ipsilaterales), es muy similar al hallado en el núcleo oral del trigémino (183-349 neuronas ipsilaterales). Esta importante población de neuronas nociceptivas presentes en el núcleo paratrigeminal refuerza aún más la importancia de este núcleo en el procesamiento de la información dolorosa orofacial. De hecho, recientes investigaciones han hallado que en este núcleo convergen aferentes nociceptivas de tipo somático (procedencia trigeminal) y de tipo visceral (procedencia vago-glossofaríngea) (Ma *et al.*, 2007).

El único estudio que ha evaluado el efecto de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos en el tronco encefálico ha limitado su investigación al complejo nuclear sensitivo del trigémino (Takemura *et al.*, 2001). A diferencia de Takemura *et al.*

(2001) y de lo observado por nosotros en otros núcleos del complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya, no hemos hallado diferencias significativas en el nivel de expresión de c-fos en los núcleos paratrigeminales tras la administración de fármacos del sistema GABA_B. Por un lado, la administración previa de baclofeno no disminuyó el número de núcleos positivos, mientras que con el faclofeno no se observó un aumento significativo. Estos datos resultan ser cuando menos sorprendentes y sugieren que las neuronas paratrigeminales no pueden ser simplemente equiparadas a las neuronas de la lámina I del núcleo caudal del trigémino y de C1. De hecho, cabe mencionar la convergencia en dichas neuronas de aferentes somáticas y viscerales (Ma *et al.*, 2007).

5.3.4. Núcleo oral

La expresión de c-fos observada en la región ventral del núcleo oral del trigémino del cobaya, después de la aplicación de un irritante químico en la región subcutánea de las vibrisas, constituye el dato más relevante de nuestra Tesis Doctoral. La activación de neuronas del núcleo oral del trigémino del cobaya tras la aplicación de un estímulo nociceptivo en la región central de las vibrisas, corrobora la participación de los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino en el procesamiento central de la información nociceptiva orofacial. En los primeros estudios inmunohistoquímicos de c-fos, después de aplicar diversos estímulos en la región orofacial, los investigadores sólo se centraron en analizar la expresión de c-fos en la región caudal del complejo nuclear sensitivo del trigémino, es decir el núcleo caudal del trigémino (Anton *et al.*, 1991; Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a,b; Wang *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995), la región de transición entre el núcleo caudal y el núcleo interpolar (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997) y, a lo sumo, la mitad caudal del núcleo interpolar (Anton *et al.*, 1991; Segade *et al.*, 1992). En estos estudios y en otros muchos más recientes (Iwata *et al.*, 1998; Aihara *et al.*, 1999; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005; Ro *et al.*, 1999, 2003) sólo se halló expresión de c-fos en estas áreas y no en las regiones más rostrales del complejo nuclear sensitivo del

trigémico. Ello sugería dos posibilidades: a) que estos núcleos rostrales no participasen en la codificación central del dolor orofacial; b) que, aunque estas neuronas se activasen por un estímulo externo nociceptivo, no expresasen c-fos. Estas dos hipótesis han demostrado no ser ciertas, porque se han publicado estudios que han hallado expresión de c-fos en la región dorsal del núcleo oral del trigémico, después de aplicar estímulos nocivos en regiones intraorales, normalmente la pulpa dentaria (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000). Además, estimulaciones eléctricas de umbral alto en nervios de la rama mandibular con campos periféricos intraorales (Allen *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1998a) y en el propio ganglio de Gasser (Takemura *et al.*, 2000a,b, 2001) también han revelado la presencia de núcleos c-fos positivos en la región dorsal del núcleo oral del trigémico. Estos estudios inmunohistoquímicos de c-fos han confirmado lo que otras investigaciones previas habían ya establecido, es decir, que dentro del complejo nuclear sensitivo del trigémico, son los núcleos oral y caudal los que constituyen los dos centros de segundo orden más importantes en las vías del dolor orofacial. Esta hipótesis fue avalada en los últimos 30 años por pruebas anatómicas, inmunohistoquímicas y neurofisiológicas (véase el capítulo de la introducción a la presente Tesis Doctoral, páginas 39-45). Todos estos estudios, básicamente realizados en la rata, descartaron que la región ventral del núcleo oral tenga una participación en el dolor orofacial. Así, por ejemplo, la localización exclusiva en el núcleo oral dorsal del trigémico de CGRP y sustancia P (Sugimoto *et al.*, 1997a; 1998a) o la proyección de aferentes primarias trigeminales de fibras de C no peptidérgicas (IB4 positivas) sólo hacia dicho núcleo dorsal oral (Sugimoto *et al.*, 1997b). Además, cuando se aplicó un estímulo dañino en regiones faciales cutáneas de este roedor, como la región central de las vibrisas, no se halló expresión de c-fos en región alguna del núcleo oral (Strassman y Vos, 1993; Strassman *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994, 1998a; Mineta *et al.*, 1995; Vos y Strassman, 1995). Sin embargo, existen evidencias de que en otros mamíferos la región ventral del núcleo oral del trigémico puede participar en la codificación central del dolor orofacial. Así, la presencia en el gato de fibras y terminales de CGRP en esta región ventral, (Henry *et al.*, 1996), lo que también fue encontrado por nosotros en el cobaya, aunque con una distribución distinta.

A diferencia de los estudios donde se hizo una estimulación nociceptiva intraoral y en los que la expresión de c-fos fue hallada en la división dorsal del núcleo oral (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000;

Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000), nosotros hemos observado inmunorreactividad de c-fos en la subdivisión ventral del núcleo oral, tras la estimulación química dañina en la región de las vibrisas. La expresión de c-fos observada en el núcleo oral ventral del cobaya, y más concretamente en el margen ventrolateral, se solapa parcialmente con el territorio donde hemos visto fibras con CGRP y sustancia P, y donde hemos hallado áreas de terminación de fibras primarias trigeminales de las vibrisas marcadas con CTb-HRP. Esto significa que no puede descartarse que algunas de estas neuronas, como aquellas localizadas dentro del propio tracto espinal del trigémino a este nivel (núcleo paratrigeminal rostral), puedan ser activadas monosinápticamente por aferentes primarias de las vibrisas. Por el contrario, las neuronas con inmunorreactividad de c-fos halladas en el margen ventromedial del núcleo oral ventral sólo han podido ser activadas polisinápticamente (presumiblemente por fibras ascendentes del núcleo caudal del trigémino), puesto que en este margen no se han hallado ni aferentes trigeminales de las vibrisas ni expresión de CGRP.

Como ya hemos mencionado, las publicaciones mencionadas en los párrafos anteriores prácticamente están circunscritas al núcleo dorsal oral del trigémino, pero muchas de sus conclusiones muy bien podrían aplicarse a la división ventral del cobaya. Por un lado, algunas investigaciones han demostrado que la sensibilización central de las neuronas del núcleo oral del trigémino, frente a la aplicación de estímulos nociceptivos en la región orofacial, depende de la integridad funcional del núcleo caudal. Así, microinyecciones de morfina en la sustancia gelatinosa del núcleo caudal del trigémino inhiben las respuestas nociceptivas en el núcleo oral (Dallel *et al.*, 1998), lo que también sucede con microinyecciones de cloruro de cobalto en dicho núcleo caudal del trigémino (Chiang *et al.*, 2002); por el contrario, el bloqueo del núcleo interpolar del trigémino con microinyecciones de cloruro de cobalto no produce cambios en la respuesta nociceptiva del núcleo oral del trigémino (Chiang *et al.*, 2002). Parece ser que los receptores purinérgicos, en particular P2X(3) y P2X(2/3), presentes en el núcleo caudal del trigémino, juegan un papel importante en la iniciación y mantenimiento de la sensibilización central de las neuronas nociceptivas del núcleo oral del trigémino (Hu *et al.*, 2002). Todo ello hace suponer que deberían existir conexiones ascendentes desde el núcleo caudal hacia el núcleo oral, y, en efecto, estas conexiones se han demostrado con neurotrazadores en el gato (Ikeda *et al.*, 1984; Nasution y Shigenaga, 1987) y en la rata (Voisin *et al.*, 2002). Según estas investigaciones, las proyecciones ascendentes desde el núcleo caudal mantienen la misma organización

somatotópica dorsoventral que las aferentes primarias trigeminales que proyectan a los núcleos caudal y oral. Es decir, las regiones dorsal, intermedia y ventral del núcleo caudal proyectan a las zonas dorsal, intermedia y ventral del núcleo oral, respectivamente. Esto significa que las fibras ascendentes de la región caudal dorsomedial, que son las que reciben aferentes primarias de las ramas mandibulares con campos periféricos intraorales (Jacquin *et al.*, 1983; Shigenaga *et al.*, 1986a,c, 1989; Takemura *et al.*, 1987, 1991; Segade *et al.*, 1990), conectarían con el núcleo oral dorsal, mientras que las procedentes de la región media y ventral del núcleo caudal establecerían conexiones con el núcleo ventral, que es el que recibe aferentes primarias maxilo-oftálicas (Marfurt, 1981; Panneton y Burton, 1981; Jacquin y Rhoades, 1983; Shigenaga *et al.*, 1986b), estando entre estas últimas las procedentes de la región subcutánea de las vibrisas (Nomura *et al.*, 1986). Esta misma distribución somatotópica se conservaría en la expresión de c-fos en el núcleo oral. Así, la estimulación nociceptiva en territorios periféricos intraorales, dependientes principalmente de la rama mandibular del trigémino, induciría expresión de c-fos en la región dorsomedial (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998a,b; Byers *et al.*, 2000; Fujiyoshi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000), mientras que la aplicación de irritantes químicos en regiones faciales dependientes de las ramas maxilo-oftálicas, como es el caso de nuestra investigación en la región de las vibrisas del cobaya, resultaría en inmunorreactividad de c-fos en la región ventral de dicho núcleo oral del trigémino.

A la altura del núcleo oral del trigémino, el número total de neuronas que expresaron c-fos tras la inyección de aceite de mostaza en la región de las vibrisas fue una media de 877 neuronas, de las cuales 399 se situaron dentro del núcleo oral (349 ipsilaterales y 50 contralaterales); 494 en la formación reticular ventral adyacente al mismo (404 ipsilaterales y 90 contralaterales) y 74 en el núcleo paratrigeminal rostral (61 ipsilaterales y 13 contralaterales). Como se desprende de los datos anteriores la expresión de c-fos a nivel del núcleo oral del trigémino es marcadamente ipsilateral, pero existe un pequeño porcentaje de núcleos c-fos positivos en las regiones homólogas del lado contralateral. Esta activación contralateral muy probablemente sería de tipo polisináptico por medio de vías trigémino-reticulares y trigémino-trigeminales (Zerari-Mailly *et al.*, 2001). Las neuronas c-fos positivas registradas en el núcleo oral constituyen una población importante de las neuronas nociceptivas presentes en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y regiones adyacentes. Concretamente, el número de neuronas con expresión de c-fos observadas en el núcleo oral del cobaya tras

la estimulación con aceite de mostaza en la región de las vibrisas es aproximadamente un 7,5% del número de neuronas activadas en el núcleo caudal. Esta proporción es inferior a la observada en otros estudios en los que se han hecho otro tipo de estimulaciones nociceptivas. Así por ejemplo, tras la estimulación eléctrica del ganglio trigeminal la proporción fue del 12% (Takemura *et al.*, 2000a), después de la estimulación química pulpar fue del 15% (Allen *et al.*, 1996) y tras la estimulación eléctrica pulpar el porcentaje fue del 32-36% (Allen *et al.*, 1996; Oakden y Boissonade, 1998). A pesar de que la proporción en el cobaya es menor, el número total de neuronas activadas en el núcleo oral fue mayor que en el resto de los estudios (ejemplo: 270 neuronas (Takemura *et al.*, 2000a); 133-153 neuronas (Allen *et al.*, 1996); 240 neuronas (Oakden y Boissonade, 1998), frente a una media de 349 neuronas observadas por nosotros).

En las investigaciones en las que se ha estudiado la expresión de c-fos en ningún caso se ha analizado la distribución rostrocaudal dentro del núcleo oral. En nuestro estudio hemos observado que en dicho núcleo así como en las estructuras circundantes (núcleo paratrigeminal rostral y formación reticular), las neuronas c-fos positivas tienden a concentrarse en el tercio caudal de los mismos, de manera similar a lo que ocurre en el caso del núcleo interpolar (Segade *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Bereiter *et al.*, 1994, 1998; Coimbra y Coimbra, 1994; Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter y Bereiter, 1996; Meng y Bereiter, 1996; Bereiter, 1997; Chattipakorn *et al.*, 1999, 2002, 2005).

En nuestra investigación hemos observado que de los tres irritantes químicos empleados, el aceite de mostaza fue el que activó el mayor número de neuronas en el núcleo oral, en la formación reticular adyacente y en el núcleo paratrigeminal rostral. Sin embargo, las diferencias sólo fueron significativas entre el aceite de mostaza y la capsaicina en el núcleo oral dorsal ($p=0,042$) y entre el aceite de mostaza y la formalina en la formación reticular ($p=0,043$) y en el núcleo paratrigeminal rostral ($p=0,025$). En el estudio realizado en pulpas de gato, Iwata *et al.* (1998) hallaron también que el mayor número de núcleos marcados en el complejo nuclear sensitivo del trigémino fue con aceite de mostaza, sin embargo Allen *et al.* (1996) observaron estadísticamente más neuronas c-fos positivas en el núcleo oral después de una estimulación eléctrica pulpar que tras una estimulación química con capsaicina. Así pues, como en el caso del núcleo caudal, el aceite de mostaza se ha mostrado más efectivo que la capsaicina y la formalina para inducir expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del

trigémico. Ello es de importancia, dado que la capsaicina (Pelissier *et al.*, 2002) y la formalina (Raboisson y Dallel, 2004) se emplean en test específicos para el estudio del dolor y convendría saber si sería más útil sustituirlos por otra sustancia de resultados más constantes y de mayor amplitud, como lo es el aceite de mostaza

Cuando se estudió el efecto de los fármacos del sistema GABA_B, hemos hallado en el cobaya que el agonista del sistema GABA_B, el baclofeno, inhibe significativamente la inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral y en la formación reticular adyacente. Este efecto inhibitor del baclofeno ya fue descrito por Takemura *et al.* (2000a) en el núcleo oral de la rata, pero su efecto sólo se observó en la división dorsomedial del núcleo, mientras que en nuestra investigación el efecto es registrado en las dos divisiones del núcleo oral, tanto en el dorsal como en el ventral. Es de resaltar que la disminución de c-fos detectada en el núcleo oral ventral del cobaya no fue homogénea, puesto que desapareció por completo en el margen ventromedial, disminuyó en los márgenes ventral y lateral, y se mantuvo en la región paratrigeminal rostral. Esto supone que la modulación del sistema GABAérgico B en el núcleo oral ventral no se hace de modo indiscriminado y preferentemente afecta más a las regiones mediales que a las laterales. Por otra parte, tras la administración intraperitoneal de baclofeno, nosotros no hemos registrado cambios significativos en la expresión de c-fos en el núcleo oral ni en la formación reticular adyacente con respecto a la estimulación con aceite de mostaza. Estas observaciones difieren de los resultados obtenidos por Takemura *et al.* (2000a). quienes tras aplicar un estímulo eléctrico de alta intensidad en el ganglio trigeminal, previo tratamiento sistémico con baclofeno, observaron un aumento significativo de la inmunorreactividad de c-fos en el núcleo oral dorsomedial. En base a los resultados de nuestro estudio podemos concluir que el núcleo oral y la formación reticular adyacente están reguladas, de algún modo, por aferentes GABAérgicas, tal y como se comprueba por la inhibición de la expresión de c-fos registrada en ambas estructuras tras la administración de baclofeno. Por el contrario, el núcleo paratrigeminal rostral del cobaya no parece estar sometido a un control GABAérgico, ni excitatorio ni inhibitorio, dado que no hemos hallado diferencias significativas cuando se administraron sistémicamente el baclofeno o el baclofeno en comparación a cuando sólo se hizo la estimulación con el aceite de mostaza.

En nuestro estudio en el cobaya queda demostrada, como en la rata, la participación de los dos núcleos del trigémico, caudal y oral, en la codificación central del dolor orofacial, pero cabe preguntarnos qué papel juega cada uno de ellos. Los

estudios más recientes, todos ellos realizados en la rata, indican que ejercen un papel distinto. Por ejemplo, se ha observado una distinta expresión temporal de c-fos entre el núcleo caudal y el oral cuando se mueven experimentalmente los dientes (Fujiyoshi *et al.*, 2000): mientras que en el caudal la expresión es máxima a las 2 horas, en el oral no se detecta hasta las 12 horas y se incrementa paulatinamente hasta las 72 horas. Por otro lado, las investigaciones anatómicas más recientes realizadas en la rata confirman que tanto el núcleo caudal como el núcleo oral proyectan al complejo posteroventromedial del tálamo y al núcleo posterior talámico (De Chazeron *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 2005), centros somatosensoriales implicados en la codificación a este nivel del dolor. Estudios fisiológicos aplicando aceite de mostaza en la pulpa de molares de rata, han sido capaces de registrar neuronas nociceptivas en las regiones contralaterales talámicas mencionadas anteriormente, es decir, los núcleos posteroventromedial y posterior talámicos (Zhang *et al.*, 2006), pero también han demostrado que la sensibilización nociceptiva de estas neuronas talámicas depende de la integridad funcional del núcleo caudal del trigémino y no del núcleo oral (Park *et al.*, 2006).

5.3.5. Núcleo principal

En nuestra investigación con aceite de mostaza hemos hallado una leve expresión de c-fos ipsilateralmente en el núcleo principal del trigémino y región intertrigeminal adyacente del cobaya. Dicha expresión de c-fos también se halló con los experimentos en que se hizo un tratamiento previo con faclofeno, encontrándose que el número de núcleos marcados no varió significativamente. Estos resultados señalan que el núcleo principal del trigémino participa, aunque mínimamente, en la codificación de información nociceptiva facial. En la literatura consultada, la gran mayoría de estudios electrofisiológicos no han sido capaces de hallar registros positivos en el núcleo principal, frente a estímulos nociceptivos orofaciales cutáneos (ej. Azerad *et al.*, 1982), con excepción de Jacquin *et al.* (1988b), que caracterizaron algunas neuronas nociceptivas en la región ventral del núcleo principal del trigémino. Igualmente, algunos estudios inmunohistoquímicos, como son los encaminados a analizar la expresión de CGRP, sugieren una posible participación del núcleo principal del trigémino en los procesos nociceptivos orofaciales (Batten *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Bennett-Clarke y Chiaia, 1992; Henry *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997a). Sin embargo, esta

participación estaría limitada al núcleo principal dorsal donde terminan aferentes primarias pulpaes (Westrum *et al.*, 1980, 1981; Arvidsson y Gobel, 1981; Marfurt y Turner, 1984; Ishidori *et al.*, 1986; Shigenaga *et al.*, 1986c, 1989). De hecho, Takemura *et al.* (2000a) después de una estimulación eléctrica de umbral alto en el ganglio de Gasser hallaron una leve expresión de c-fos en la división dorsal del núcleo principal, de la misma forma que Sessle y Greenwood (1976) registraron actividad neuronal en el núcleo principal dorsal tras estimulaciones eléctricas pulpaes. A modo de resumen de lo comentado anteriormente, se entrevé que si el núcleo principal participara en la transmisión de la información nociceptiva lo haría de aquella procedente de las estructuras intraorales, puesto que hasta el momento y a excepción del estudio de Jacquin *et al.* (1988b), la implicación de este núcleo en la transmisión de impulsos dolorosos desde estructuras extraorales ha sido desestimada.

La región del núcleo principal del cobaya donde hemos observado expresión de c-fos no se corresponde con el territorio donde hemos hallado aferentes primarias de las vibrisas marcadas con los conjugados CTB-HRP o IB4-HRP, por lo que podemos afirmar que las neuronas c-fos positivas del núcleo principal del cobaya no han sido activadas por fibras aferentes primarias. La inmunorreactividad de c-fos que hemos registrado en el núcleo principal probablemente pueda ser atribuible a conexiones intranucleares ascendentes, principalmente procedentes del núcleo caudal del trigémino (Ikeda *et al.*, 1984; Nasution y Shigenaga, 1987). Estas conexiones intranucleares, suponemos que están moduladas por el sistema GABA_B, puesto que cuando hicimos una estimulación periférica después de administrar un tratamiento sistémico con baclofeno, la expresión de c-fos del núcleo principal desapareció.

5.3.6. Complejo nuclear parabraquial

Expresión de c-fos en el complejo parabraquial se ha observado bilateralmente en todos los cobayas estudiados en la presente Tesis Doctoral, incluso en aquellos que nos han servido de control, como son los pertenecientes al grupo en el que sólo se aplicó la anestesia o al grupo en el que se inyectó el aceite mineral (su número osciló entre 152-222 núcleos en cada complejo parabraquial). Cuando se inyectó aceite de mostaza en la región subcutánea de las vibrisas, el número de neuronas marcadas aumentó significativamente en ambos complejos parabraquiales (ipsilateralmente, $n = 1199 \pm$

315; contralateralmente, $n = 965 \pm 193$). Esta expresión de c-fos en el complejo parabraquial del cobaya también se ha demostrado en la rata cuando se aplicaron estímulos periféricos nocivos en diversas regiones del cuerpo, tales como el cuello (Hermanson y Blomqvist, 1996), la cola (Hermanson y Blomqvist, 1996) y extremidades posteriores (Hermanson y Blomqvist, 1996; Bester *et al.*, 1997). Estas experiencias ayudaron a confirmar la existencia de una vía espino-parabraquial implicada en los procesos nociceptivos, tal como había sido sugerida por estudios electrofisiológicos (Bernard y Besson, 1990) y por estudios anatómicos con neurotrazadores (Bernard *et al.*, 1995). La inmunohistoquímica con c-fos también fue capaz de mostrar la activación polisináptica de las neuronas parabraquiales de la rata después de la aplicación de un estímulo periférico nociceptivo en la región orofacial (Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997; Yamashiro *et al.*, 1997), o después de estimular eléctricamente de modo directo el ganglio de Gasser (Takemura *et al.*, 2000a), reforzando todo ello las evidencias anteriores basadas en estudios electrofisiológicos (Hayashi y Tabata, 1989b, 1990; Bernard y Besson, 1990). La codificación del dolor orofacial en el complejo parabraquial implica la existencia de conexiones trigémino-parabraquiales, que hoy son bien conocidas gracias a las investigaciones llevadas a cabo con diversos neurotrazadores (Panneton *et al.*, 1994; Slugg y Light, 1994; Wang *et al.*, 1994; Feil y Herbert, 1995; Allen *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997; Dallel *et al.*, 2004). Gracias a estos estudios, sabemos que las conexiones trigémino-parabraquiales proceden tanto del núcleo caudal del trigémino (Panneton *et al.*, 1994; Slugg y Light, 1994; Wang *et al.*, 1994; Feil y Herbert, 1995; Allen *et al.*, 1996) como de los núcleos interpolar (Yoshida *et al.*, 1997), oral (Yoshida *et al.*, 1997; Dallel *et al.*, 2004) y principal (Yoshida *et al.*, 1997). Aunque las proyecciones de los núcleos rostrales son fundamentalmente ipsilaterales, las que se originan en el núcleo caudal del trigémino son bilaterales, y ello explica porqué la expresión de c-fos hallada en el complejo parabraquial del cobaya es bilateral. Analizando la literatura, el carácter bilateral de la representación nociceptiva orofacial en el complejo parabraquial varía de una experiencias a otras; así, cuando se aplicó un estímulo nocivo al labio inferior (Hermanson y Blomqvist, 1997), a la mucosa nasal y al nervio etmoidal (Dutschmann y Herbert, 1997), se halló una preponderancia de núcleos c-fos positivos en el complejo parabraquial ipsilateral; en cambio, cuando se analizó la expresión de c-fos en áreas parabraquiales después de movimientos ortodóncicos

de los dientes se observó que no había diferencia significativa entre ambos lados (Yamashiro *et al.*, 1997). En nuestro estudio en el cobaya, no se han hallado en ninguno de los grupos investigados (animales control, grupos del aceite de mostaza, del faclofeno y del baclofeno) diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas parabraquiales de un lado y otro.

Cuando hemos analizado la localización de los núcleos c-fos positivos en las distintas agrupaciones nucleares del complejo parabraquial del cobaya, se ha comprobado que la mayor parte de ellos se hallan en los subnúcleos que conforman la agrupación lateral, lo que también se ha hallado en otras experiencias en las que se aplicó un estímulo dañino en el área orofacial (Dutschmann y Herbert, 1997; Hermanson y Blomqvist, 1997).

Cuando se ha analizado el grupo de experimentación del faclofeno, se ha comprobado una vez más que el número de neuronas activadas en cada complejo parabraquial es muy similar al obtenido con el grupo del aceite de mostaza. Este dato avala una vez más que en el cobaya este antagonista del GABA_B no produce los mismos efectos que en la rata (Takemura *et al.*, 2001). Esto es lógico, puesto que la activación de neuronas parabraquiales se produce en parte por neuronas trigeminales localizadas en el núcleo caudal del trigémino y en el asta dorsal de C1, y ya hemos mencionado que a este nivel no se produce un aumento significativo de núcleos c-fos positivos. Por el contrario y en la misma línea que lo mencionado en capítulos anteriores, el baclofeno produce una disminución significativa en ambos núcleos, efecto lógico producido por la disminución de la expresión de c-fos en las regiones trigeminales que proyectan a este nivel pontino.

5.3.7. Formación reticular adyacente al complejo nuclear sensitivo

Después de aplicar un irritante químico en la región de las vibrisas, hemos observado expresión de c-fos en la formación reticular adyacente al complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya, especialmente en la región ventral, desde la región rostral del núcleo oral hasta el comienzo del núcleo caudal del trigémino, donde enlaza con la lámina V. La inmunorreactividad de c-fos en la formación reticular ha sido previamente descrita en la rata (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Strassman *et*

al., 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Mineta *et al.*, 1995; Meng y Bereiter, 1996; Dutschmann y Herbert, 1997). Sin embargo, a excepción del estudio de Carstens *et al.* (1995) en ningún caso se habla de expresión de c-fos rostralmente a la mitad caudal del núcleo interpolar.

La distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas fue irregular, adoptando un perfil similar al señalado en relación a los núcleos paratrigeminales. La expresión de c-fos tendió a localizarse en el polo caudal del núcleo oral y en el polo caudal del núcleo interpolar. Esta expresión de c-fos en el núcleo interpolar se corresponde con la inmunorreactividad de c-fos que la mayoría de los autores refieren a la altura del área postrema en la región de transición del núcleo interpolar con el núcleo caudal (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Hathaway *et al.*, 1995; Meng y Bereiter, 1996; Dutschmann y Herbert, 1997).

La distribución de la expresión de c-fos en la formación reticular ventral adyacente al complejo nuclear sensitivo del trigémino del cobaya hemos visto que, a nivel del polo caudal del núcleo oral y de gran parte del interpolar, se solapó con el territorio de terminación de fibras CGRP positivas. Esta proyección de fibras con inmunorreactividad para este péptido nociceptivo es compatible con estudios realizados en ratas (Villanueva *et al.*, 1988, 1989), gatos (Kruger y Michel, 1962b; Nishikawa y Yokota, 1985; Yokota *et al.*, 1991) y monos (Nord y Ross, 1973; Price *et al.*, 1976), que señalan la presencia de neuronas nociceptivas en la formación reticular medular. No obstante, tenemos que precisar que ni con IB4-HRP ni con CTb-HRP hemos hallado en este área reticular terminales de las aferentes primarias procedentes de las vibrisas, por lo que la expresión de c-fos observada en la formación reticular ventral se debe indudablemente a una activación polisináptica a través de conexiones trigémino-reticulares, las cuales se han descrito en la rata (Esser *et al.*, 1998; Zerari-Mailly *et al.*, 2001).

Las neuronas c-fos positivas se distribuyeron bilateralmente, registrándose un significativo predominio ipsilateral a partir de la formación reticular adyacente al núcleo interpolar del trigémino. Esta misma preponderancia ipsilateral únicamente ha sido señalada por Mineta *et al.* (1995). Las restantes investigaciones por el contrario sostienen un modelo de expresión de c-fos bilateral (Lu *et al.*, 1993; Strassman y Vos, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994; Carstens *et al.*, 1995; Hathaway *et al.*, 1995; Dutschmann y Herbert, 1997). La expresión bilateral referida por estos autores en algún caso podría tener su explicación en que se hubiese producido una irradiación del estímulo al lado

contralateral. Así por ejemplo, Carstens *et al.* (1995) estimuló químicamente la lengua, observando gran expresión bilateral cuando la sustancia irritante fue aplicada en la superficie dorsal lingual, disminuyendo el componente contralateral cuando la estimulación la efectuó en el borde lateral de la misma. A nivel de la unión entre el núcleo interpolar con el núcleo caudal del trigémino, podría pensarse que la expresión de c-fos contralateral en la formación reticular ventral se debiera a la existencia de proyecciones primarias contralaterales (Jacquin *et al.*, 1990; Marfurt y Rajchert, 1991). Sin embargo, esto no es la explicación posible en nuestra investigación en el cobaya, porque la distribución central de las aferentes primarias de las vibrisas obtenida con neurotrazadores es estrictamente ipsilateral, por lo que parece más lógico suponer que esta expresión de c-fos contralateral se debe a una activación polisináptica a través de fibras trigémino-reticulares cruzadas (Zerari-Mailly *et al.*, 2001).

La expresión de c-fos inducida en la formación reticular ventral del cobaya fue significativamente inhibida por el pretratamiento con baclofeno. Por el contrario, y de la misma forma que se comentó en relación con los núcleos oral y caudal, el nivel de inmunorreactividad de c-fos en este territorio nervioso no se vio modificado tras la administración sistémica de baclofeno. El estudio de Takemura *et al.* (2001), que investigó los efectos de fármacos del sistema GABA_B en la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, no tuvo en consideración la formación reticular adyacente al mismo. En resumen, se repiten los efectos que ya hemos detallado sobre la acción de estos fármacos en la expresión de c-fos en algunos núcleos del complejo nuclear sensitivo del trigémino.

6. Conclusiones



Se ha investigado en el cobaya la expresión del protooncogén c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y en aquellas estructuras del bulbo raquídeo relacionadas con las vías centrales del dolor cutáneo facial. Para ello, se inyectaron tres irritantes químicos (formalina, capsaicina y aceite de mostaza) en la región central subcutánea de las vibrisas del lado izquierdo. También se analizó la posible modulación del sistema GABA_B sobre esta expresión de c-fos, mediante la inyección sistémica de un agonista (baclofeno) y de un antagonista (faclofeno). Para un mejor análisis de la vía dolorosa de las vibrisas, se investigó la expresión central de dos neuropéptidos presentes en fibras nociceptivas (CGRP y sustancia P), y la representación central de las aferentes primarias de las vibrisas mediante tres neurotrazadores: toxina del cólera B conjugada con la peroxidasa de rábano (CTb-HRP), aglutinina de trigo conjugada con HRP (WGA-HRP) e isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con HRP (IB4-HRP). Como resultado de la investigación estas son las principales conclusiones.

1.- La aplicación de las tres sustancias en la región de las vibrisas produjo expresión de c-fos en el núcleo caudal del trigémino y asta dorsal del primer segmento cervical (C1), en los núcleos paratrigeminales dorsal y ventral, y en las subdivisiones rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino: núcleos interpolar, oral y principal (en este caso sólo con aceite de mostaza). Además, estas sustancias produjeron expresión de c-fos bilateralmente en el complejo parabraqiual pontino y en la formación reticular adyacente al lado medial del complejo nuclear sensitivo del trigémino. Antes de nuestro estudio, la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino frente a un estímulo nocivo facial cutáneo no se había observado ni en el núcleo principal, ni en el oral ni en la región rostral del núcleo interpolar del trigémino.

2.- El aceite de mostaza en general activó un mayor número de neuronas en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y estructuras relacionadas que los otros dos irritantes; sin embargo, las diferencias no siempre fueron significativas.

3.- En el núcleo principal, la inmunorreactividad de c-fos se localizó en la zona ventromedial. En el núcleo oral del trigémino se localizó en la subdivisión ventral, principalmente en sus márgenes medial, ventral y lateral; además, se observaron núcleos c-fos positivos dentro del tracto sensitivo, formando lo que nosotros hemos denominado en conjunto núcleo paratrigeminal rostral. En el núcleo interpolar la expresión de c-fos ha quedado prácticamente confinada a su borde ventromedial, mientras que en el núcleo caudal del trigémino y en C1 los núcleos c-fos positivos se hallaron principalmente en las láminas I-IIo, y en menor porcentaje en las láminas III y V.

4.- A excepción de los núcleos paratrigeminales ventral y rostral, en los que la expresión de c-fos fue bilateral sin predominancia, y del núcleo principal, en que fue estrictamente ipsilateral, en las demás subdivisiones del complejo nuclear sensitivo del trigémino la expresión de c-fos ha sido bilateral con una marcada predominancia ipsilateral.

5.- La representación rostrocaudal de la expresión de c-fos tampoco fue homogénea. En los núcleos oral e interpolar, la gran mayoría de núcleos c-fos positivos se hallaron en el tercio caudal de los mismos. Análogamente, la expresión de c-fos en la formación reticular ventral adyacente siguió el mismo patrón de distribución que los núcleos mencionados, es decir, presentó unos picos de máxima expresión a nivel del tercio caudal de los núcleos oral e interpolar del trigémino.

6.- A pesar de que la expresión de c-fos se halló en las cuatro divisiones del complejo nuclear sensitivo del trigémino, el número de neuronas c-fos positivas halladas en los núcleos rostrales de dicho complejo sólo sumaron un 30% del número total de neuronas con inmunorreactividad de c-fos registradas en el núcleo caudal del trigémino. Ello demuestra que el núcleo caudal del trigémino es el principal centro de segundo orden en la codificación del dolor cutáneo facial.

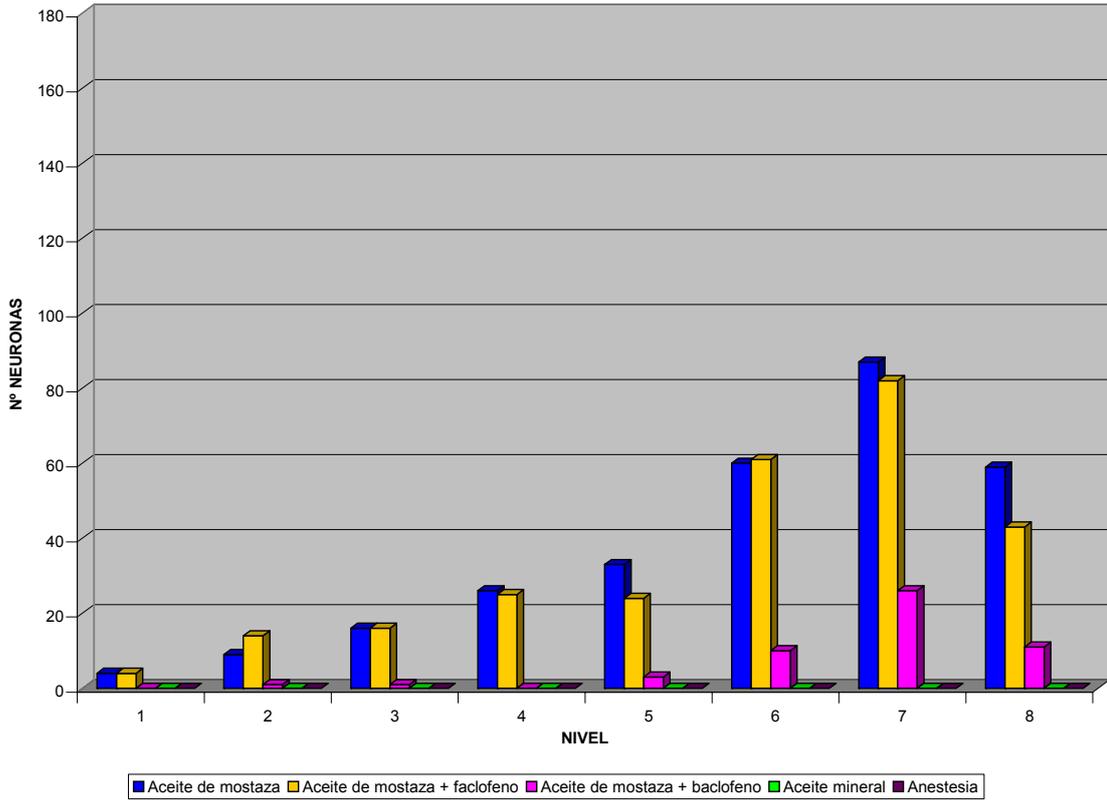
7.- La aplicación sistémica previa de faclofeno no produjo, en general, un incremento significativo de núcleos c-fos positivos tanto en el complejo nuclear sensitivo del trigémino y estructuras adyacentes como en el complejo parabraquial pontino, lo que contrasta con experiencias realizadas en la rata en las que se había apreciado un aumento notable de c-fos tras una estimulación eléctrica de umbral alto.

8.- La aplicación sistémica previa de baclofeno produjo una disminución significativa de la expresión de c-fos en el complejo nuclear sensitivo del trigémino, excepción hecha de los núcleos paratrigeminales, en la formación reticular adyacente y en el complejo parabraquial. También es de destacar que en el núcleo oral ventral se abolió por completo la inmunorreactividad de c-fos en el borde medial, quedando los pocos núcleos c-fos positivos relegados a los bordes lateral y ventral.

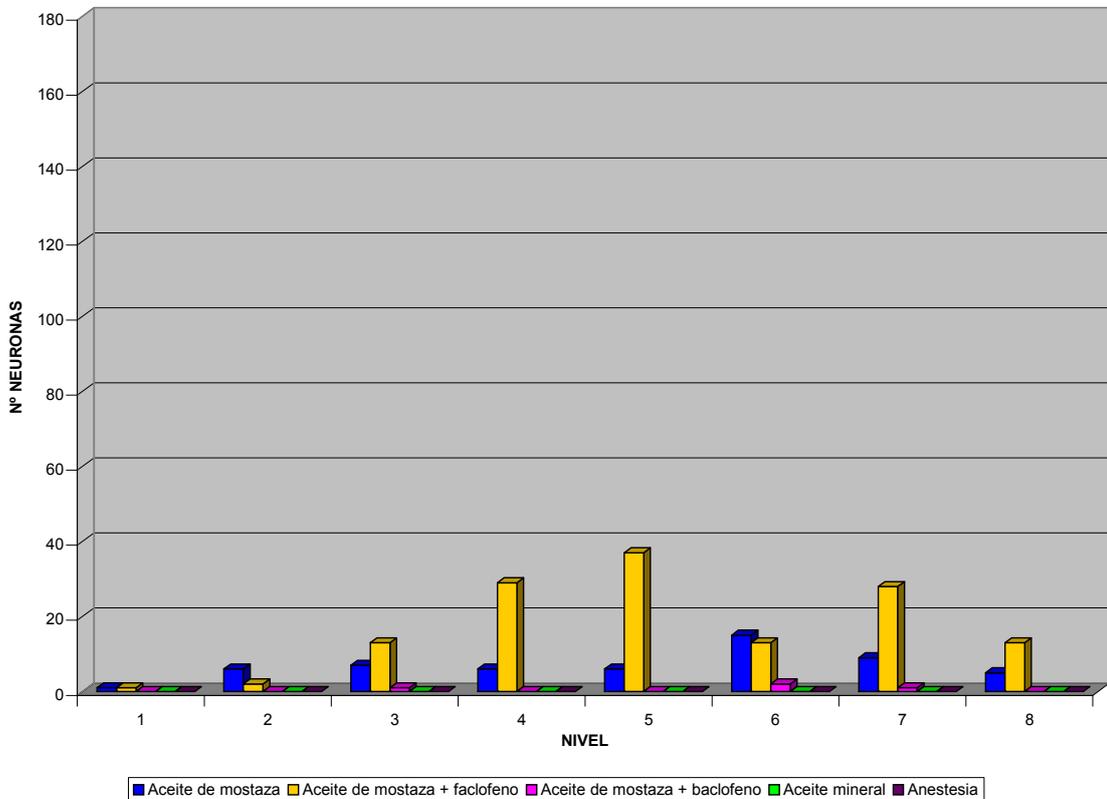
9.- La expresión de c-fos en el bulbo raquídeo del cobaya después de una estimulación química nociva cutánea facial presenta apreciables diferencias con los estudios previos realizados en la rata. Este hecho, sumado a otras características del cobaya que lo acercan más a los primates, supone que frente a la rata y otros roedores de laboratorio el cobaya puede ser usado como un modelo animal más adecuado para el estudio experimental del dolor orofacial.

7. Histogramas

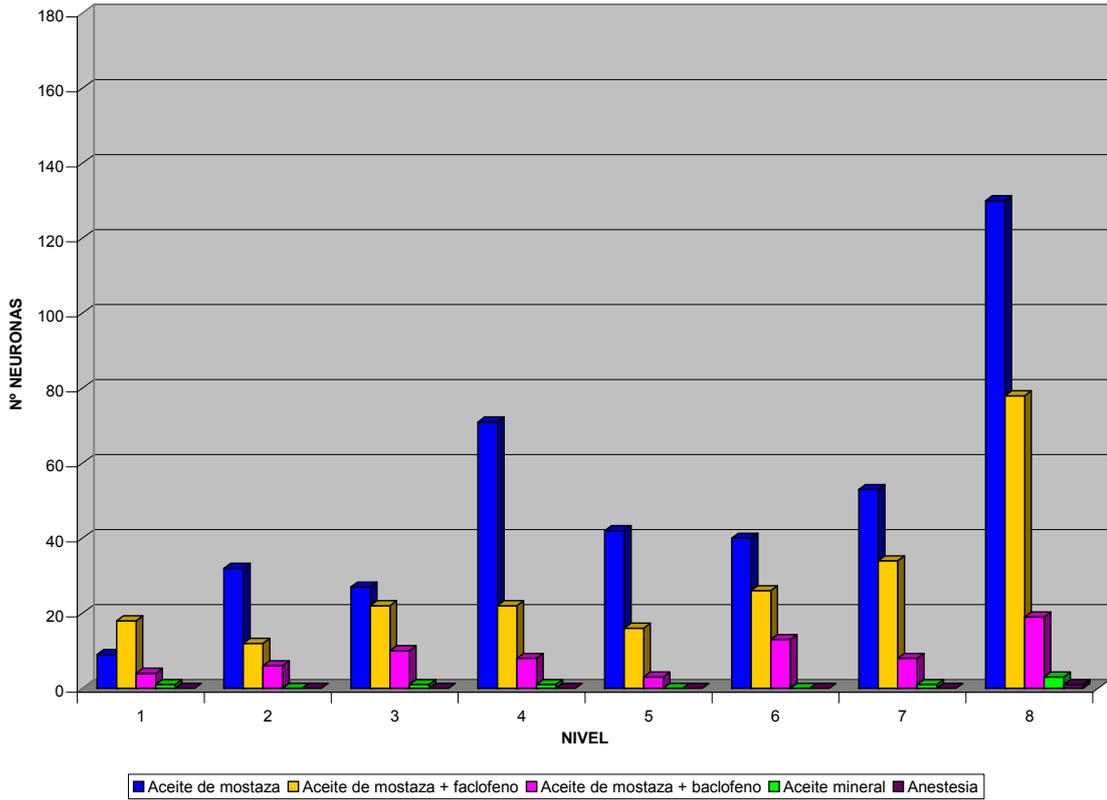




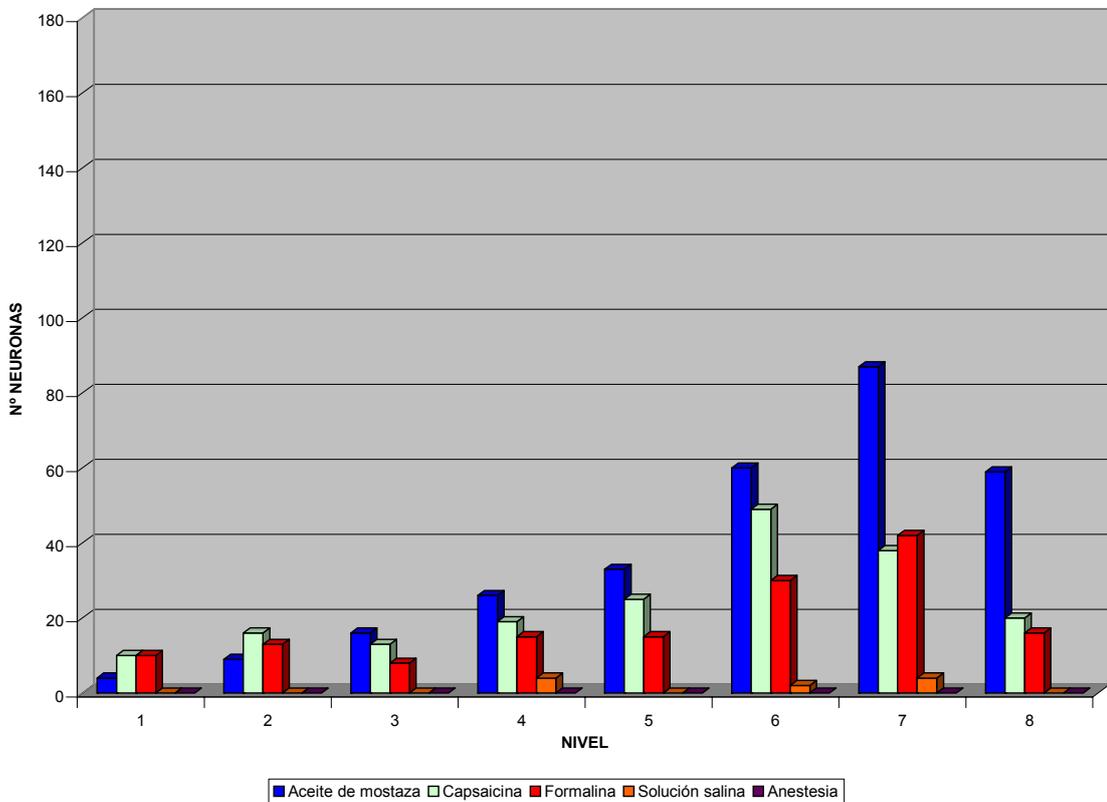
Hist. 1. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral ventral ipsilateral.



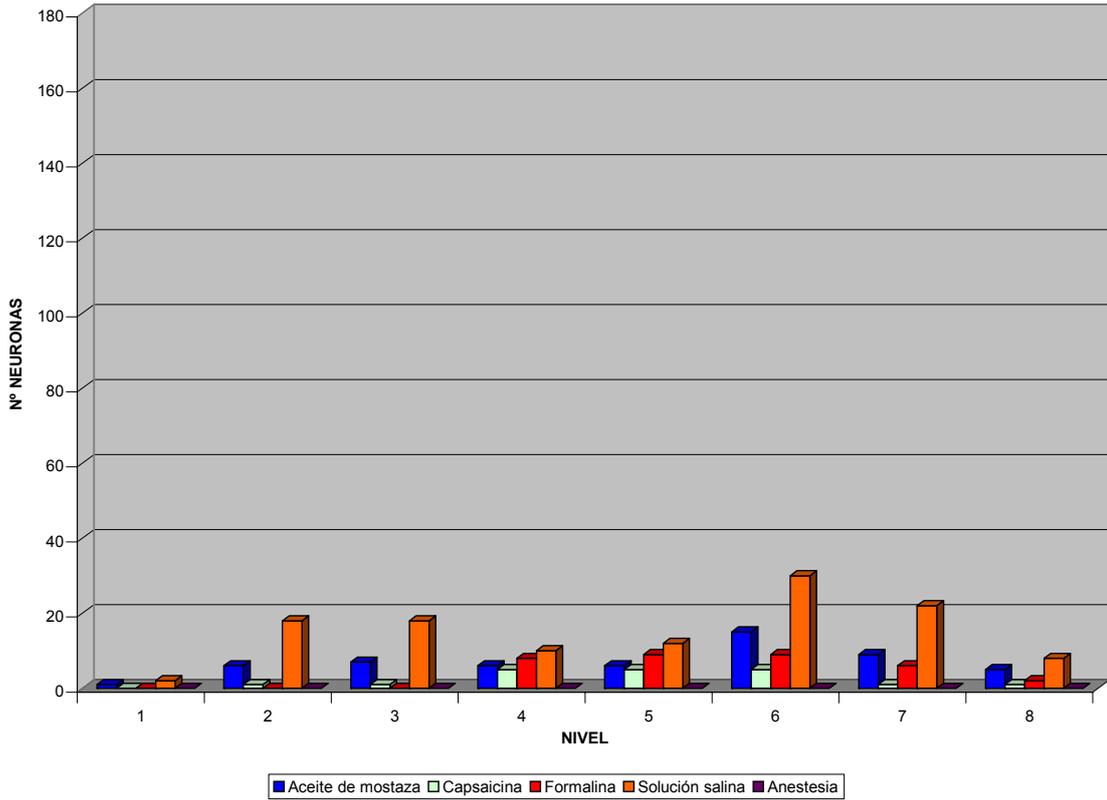
Hist. 2. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral dorsal ipsilateral.



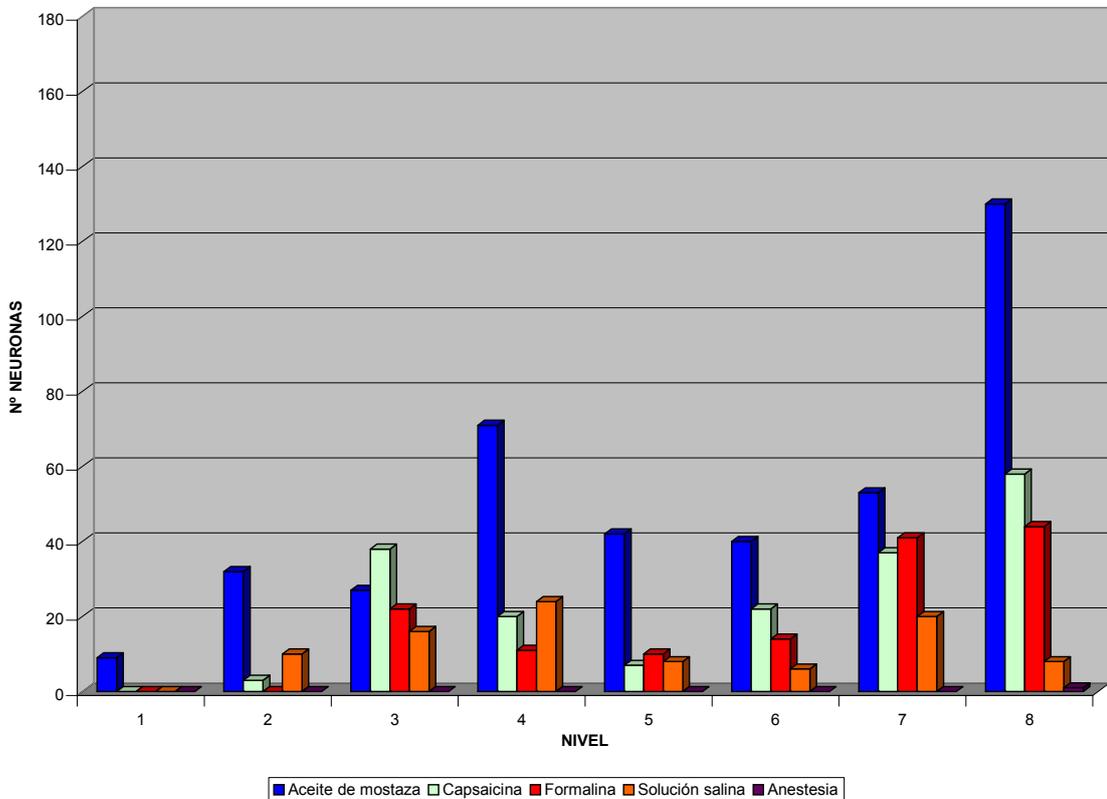
Hist. 3. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral ipsilateral.



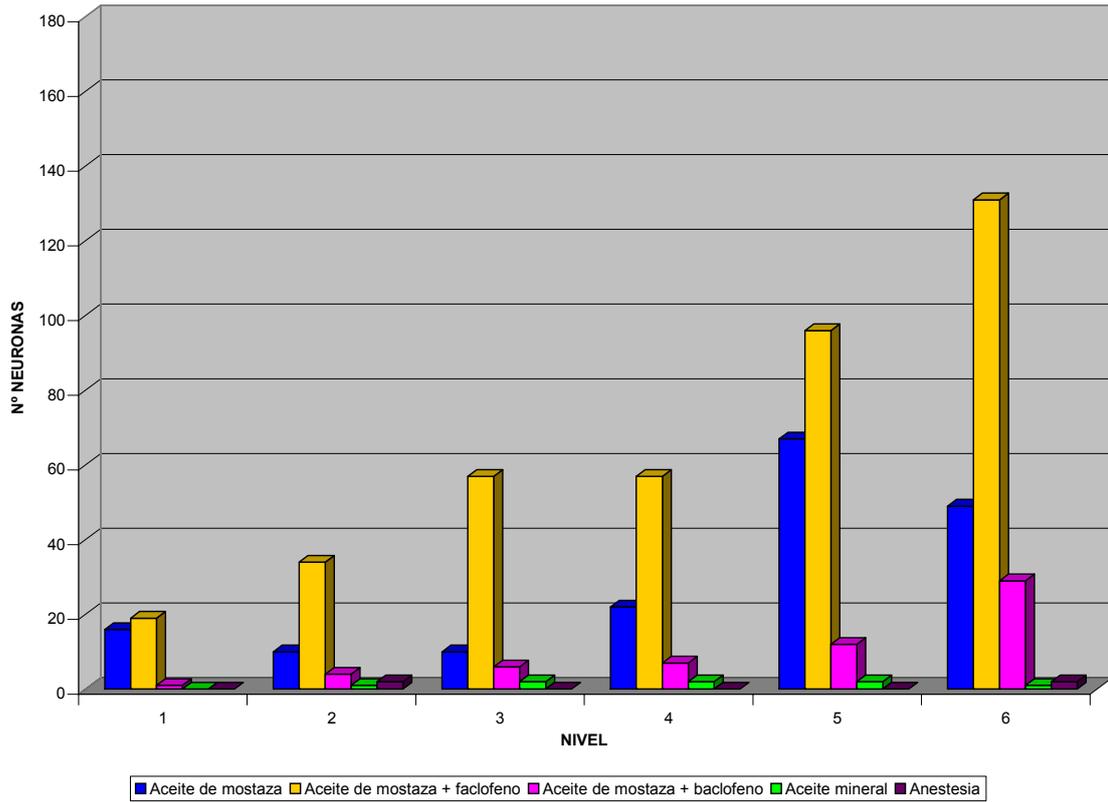
Hist. 4. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral ventral ipsilateral.



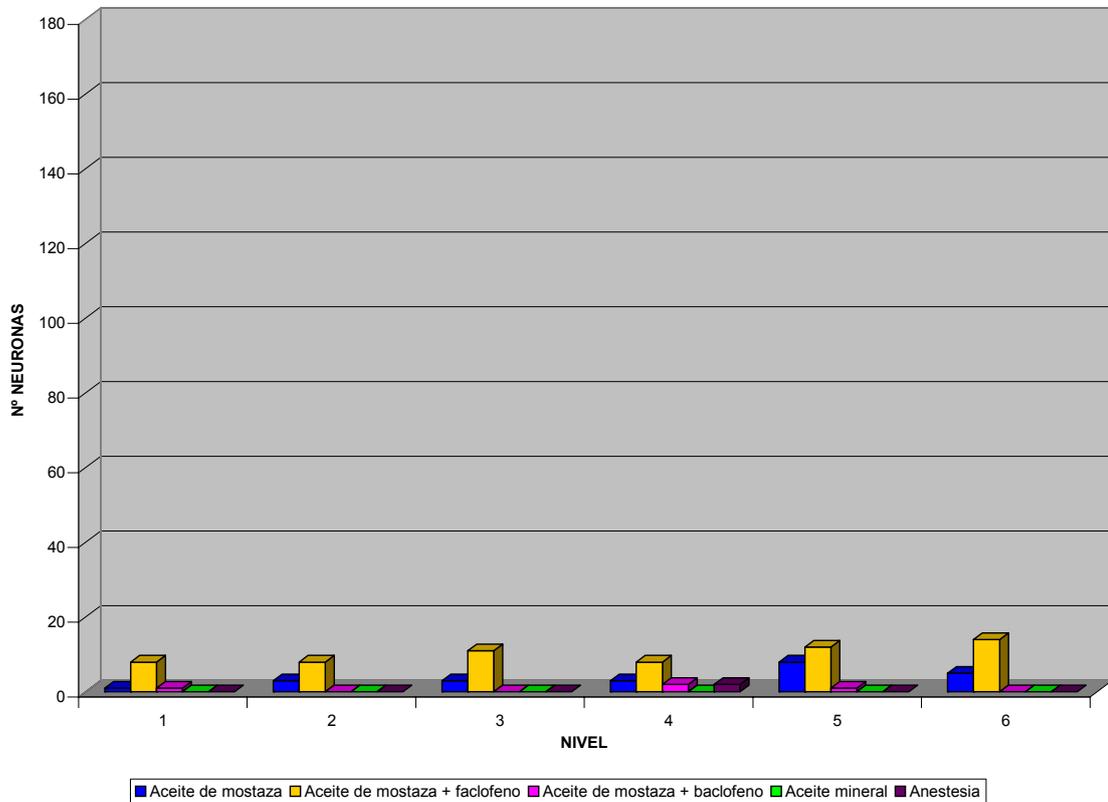
Hist. 5. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral dorsal ipsilateral.



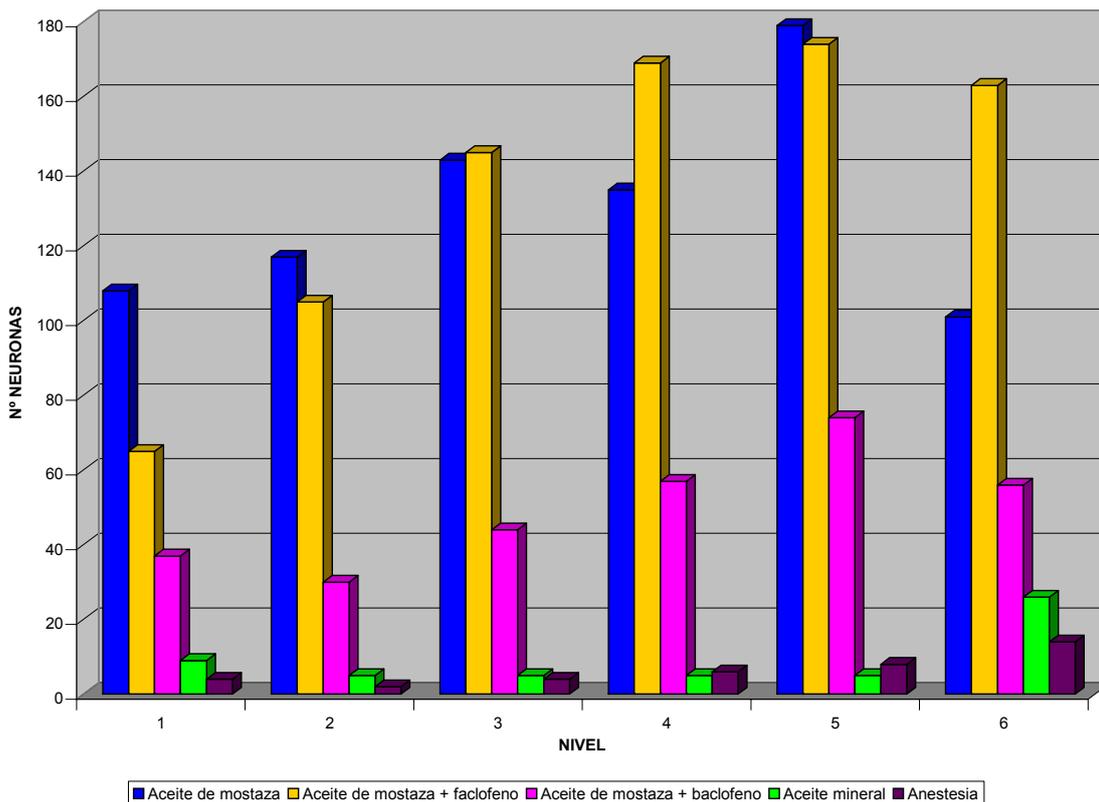
Hist. 6. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral ipsilateral.



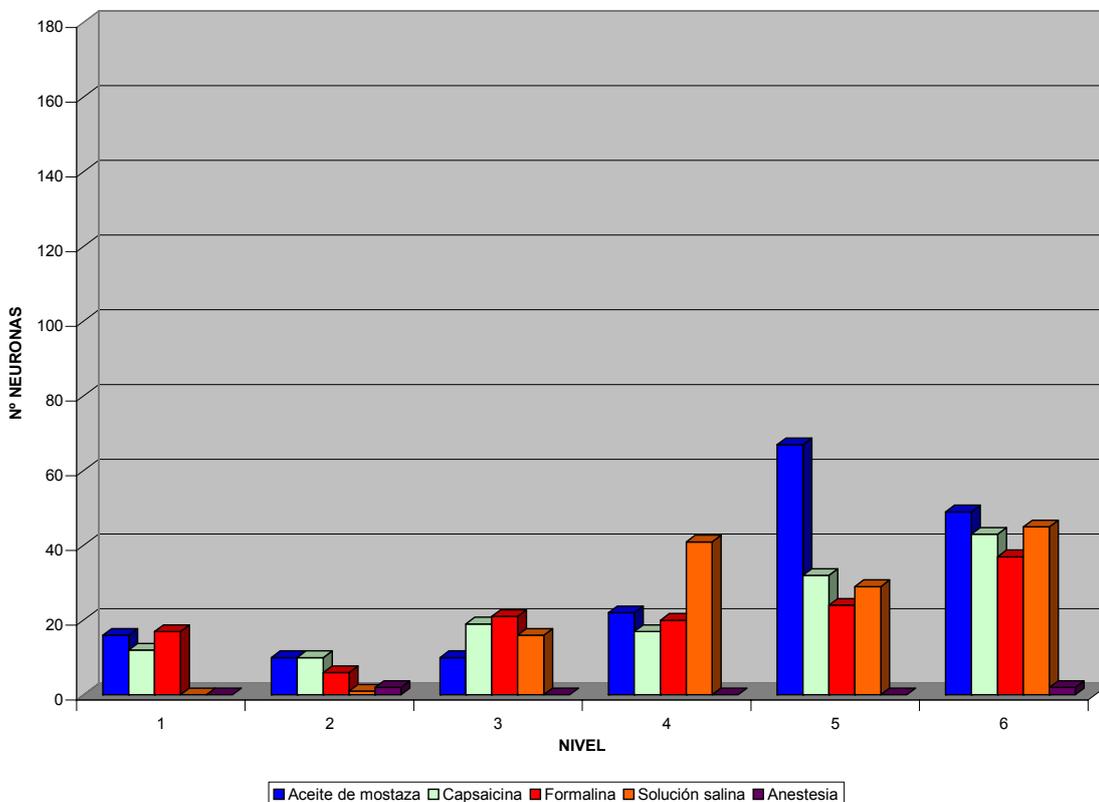
Hist. 7. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpoler ventral ipsilateral.



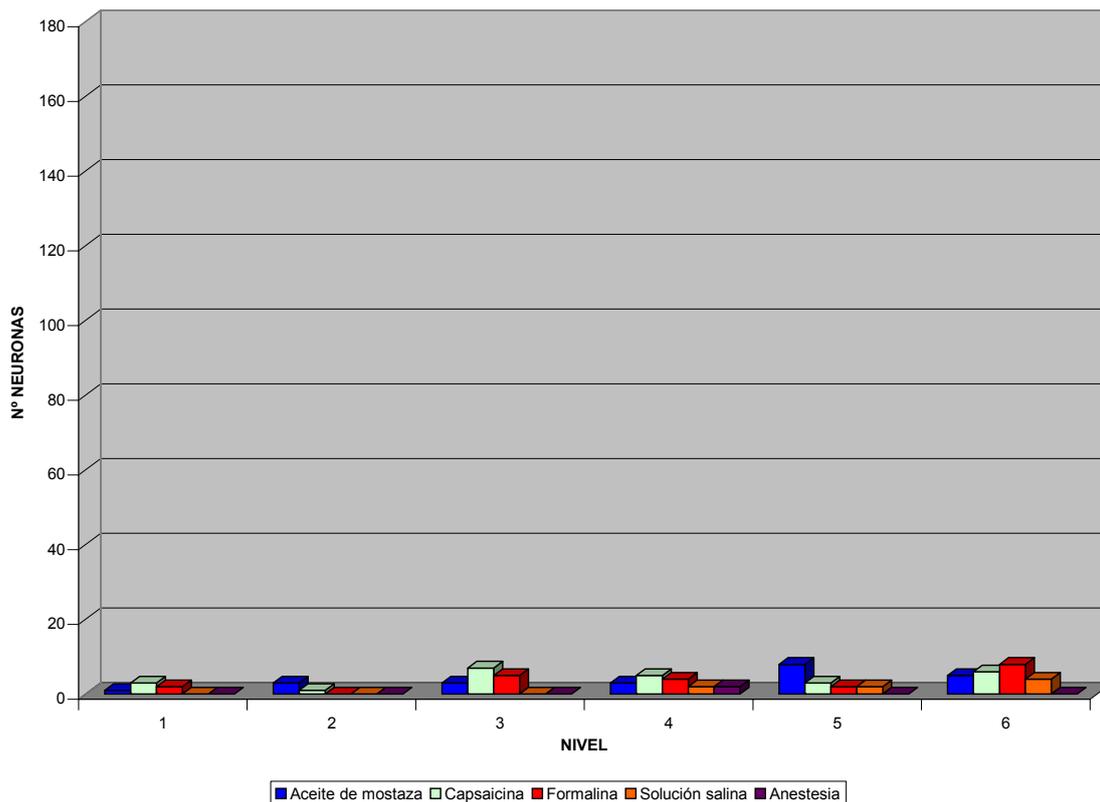
Hist. 8. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpoler dorsal ipsilateral.



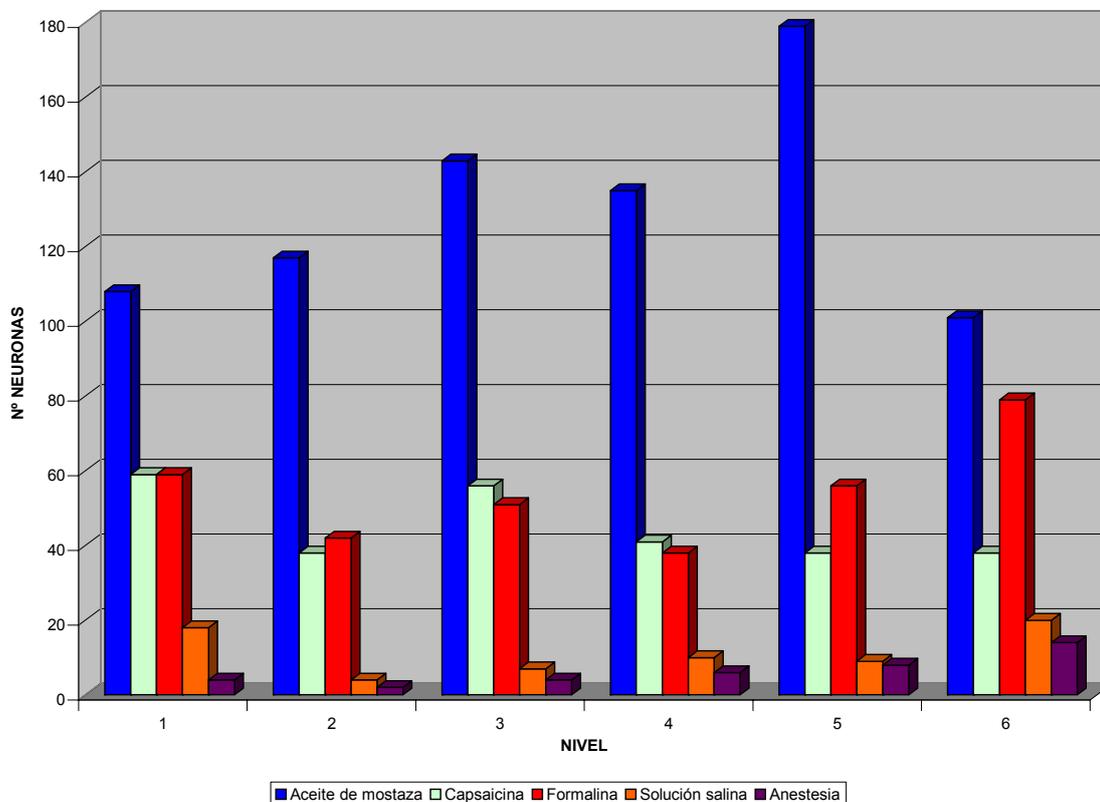
Hist. 9. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas de la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar ipsilateral.



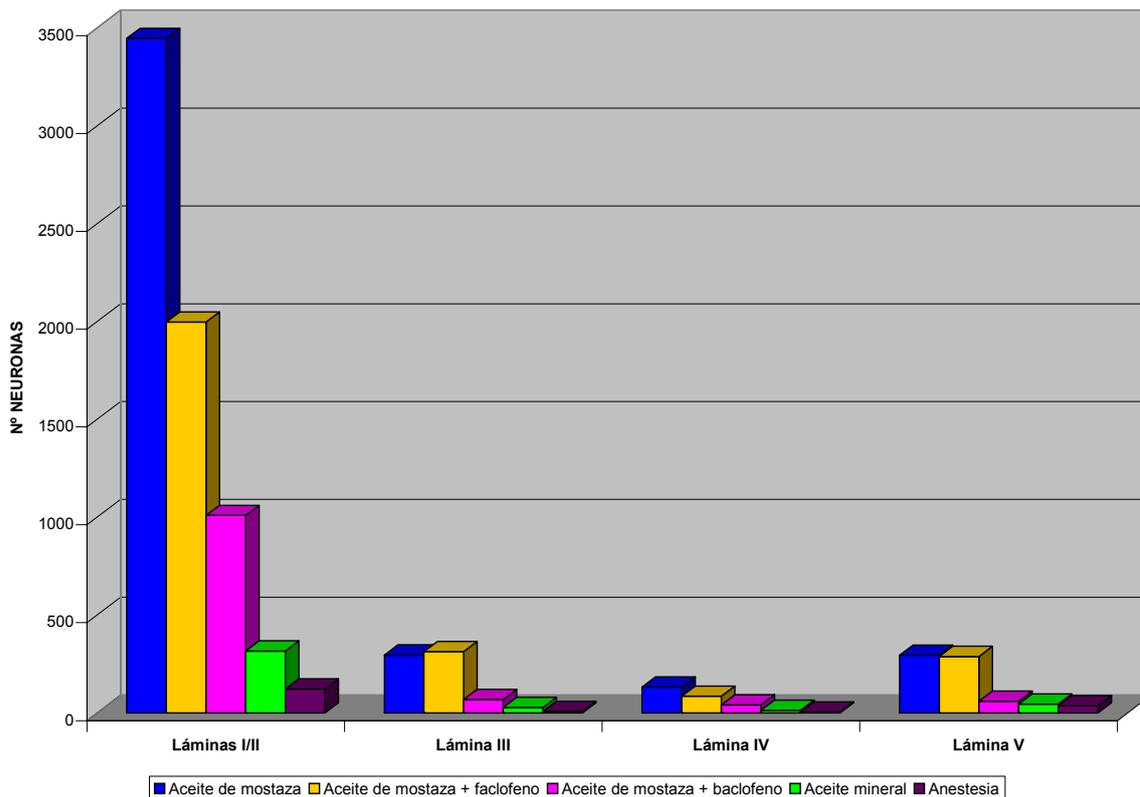
Hist. 10. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpolar ventral ipsilateral.



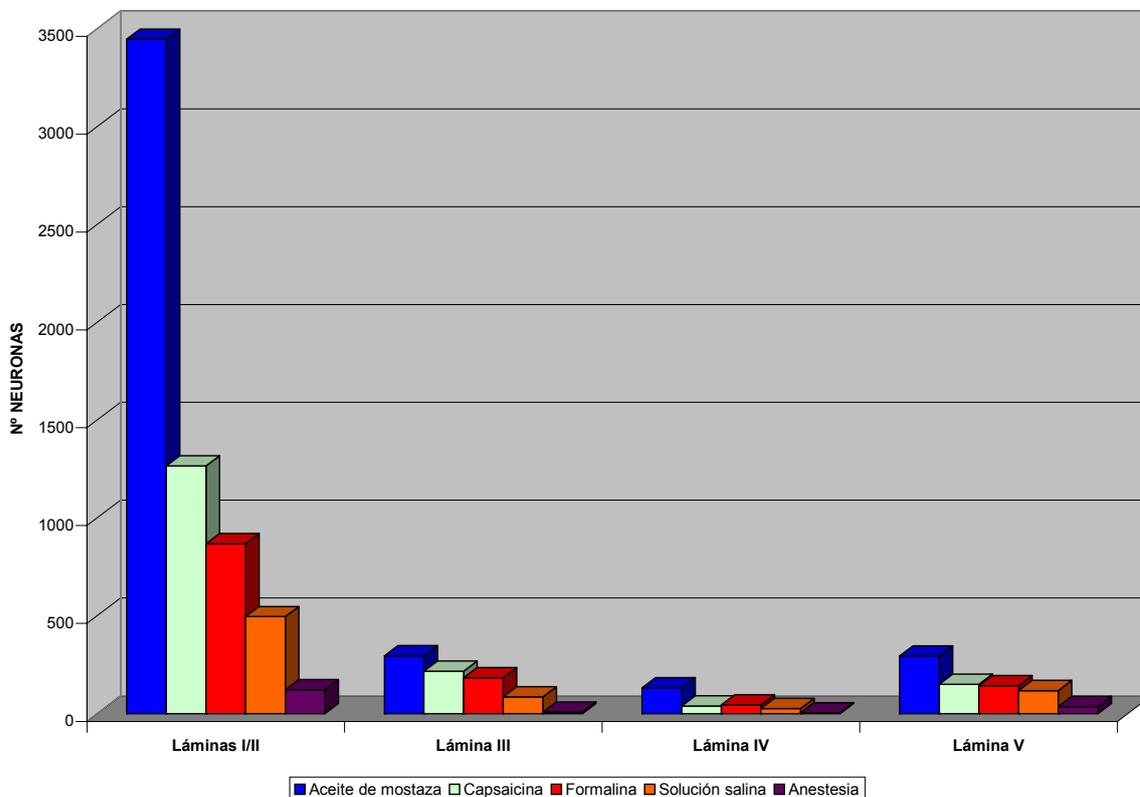
Hist. 11. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpolador dorsal ipsilateral.



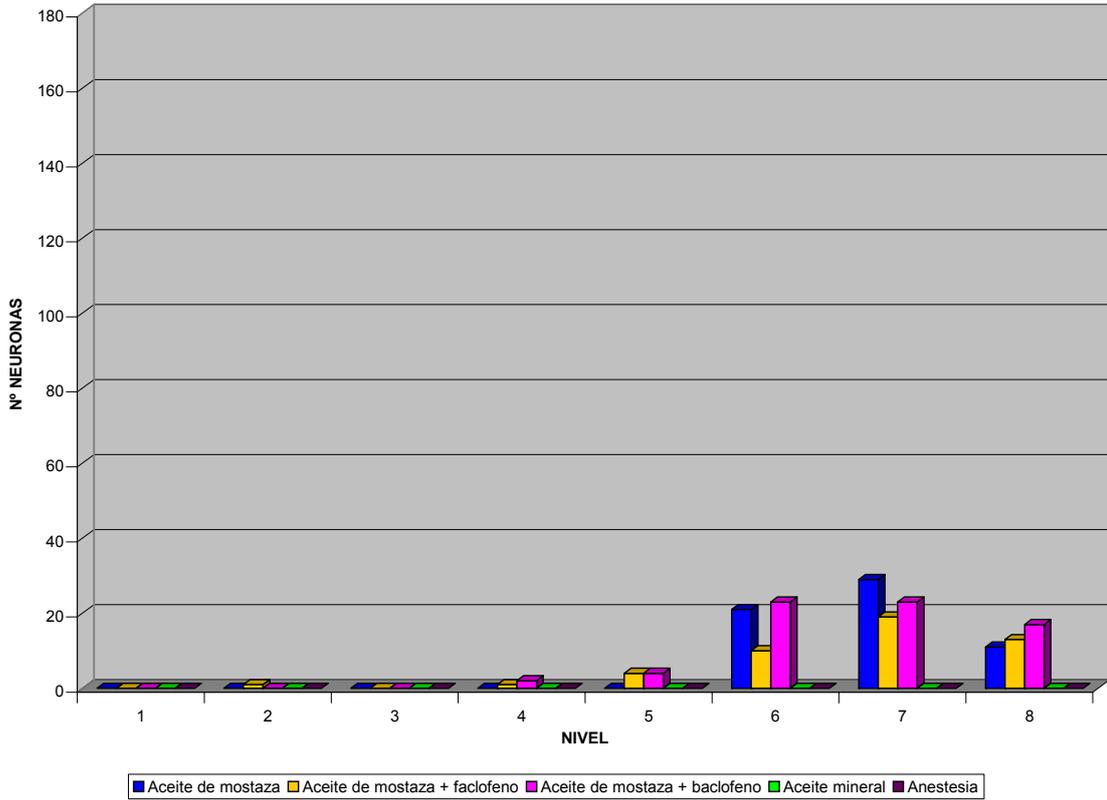
Hist. 12. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolador ipsilateral.



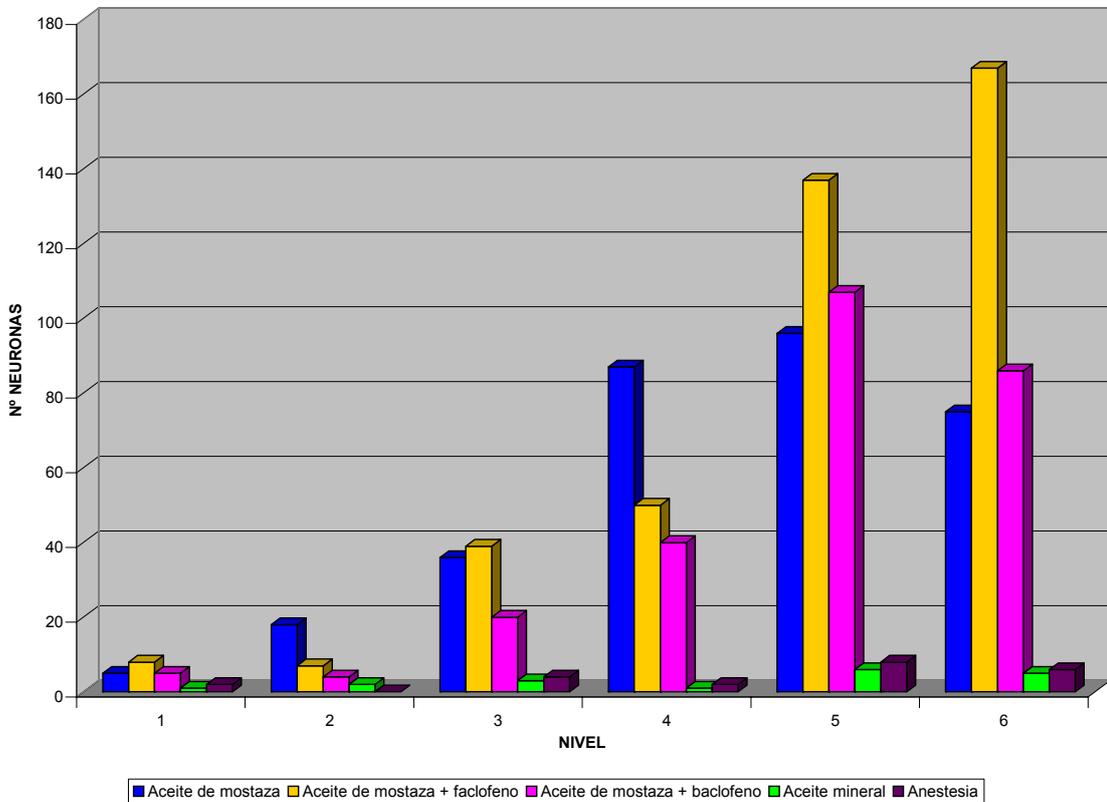
Hist. 13. Número de neuronas c-fos positivas en el núcleo caudal y primer segmento cervical ipsilaterales.



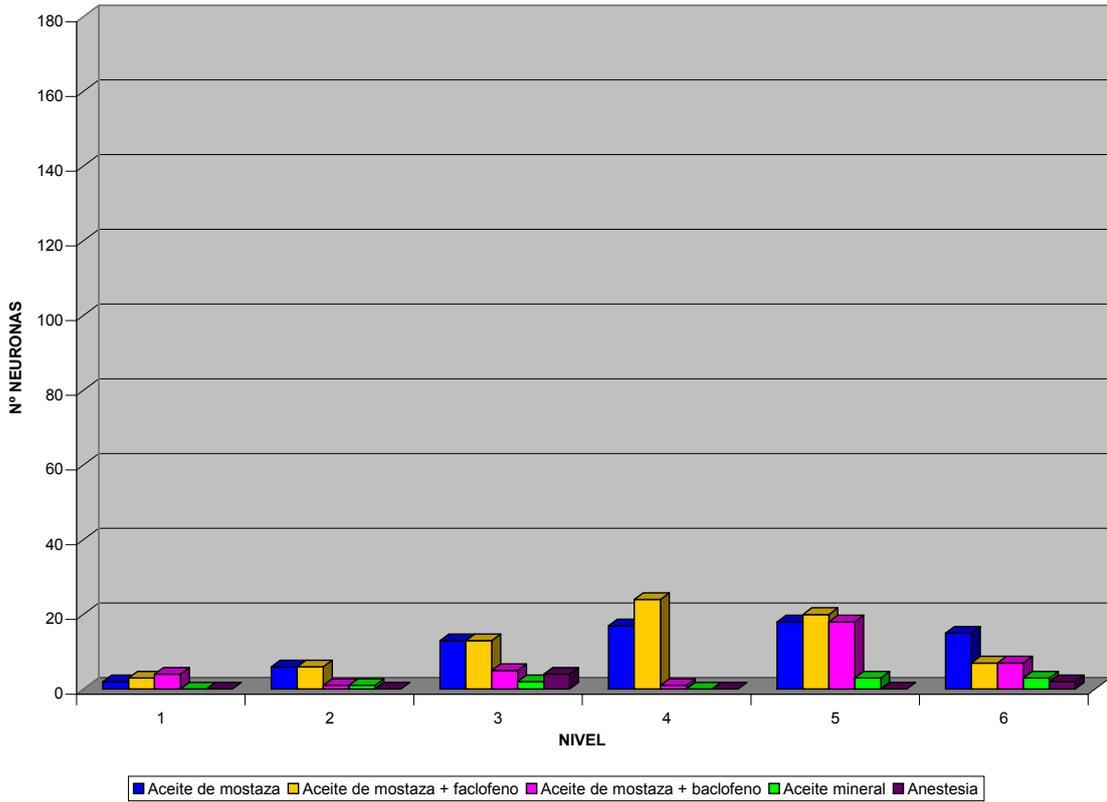
Hist. 14. Número de neuronas c-fos positivas en el núcleo caudal y primer segmento cervical ipsilaterales.



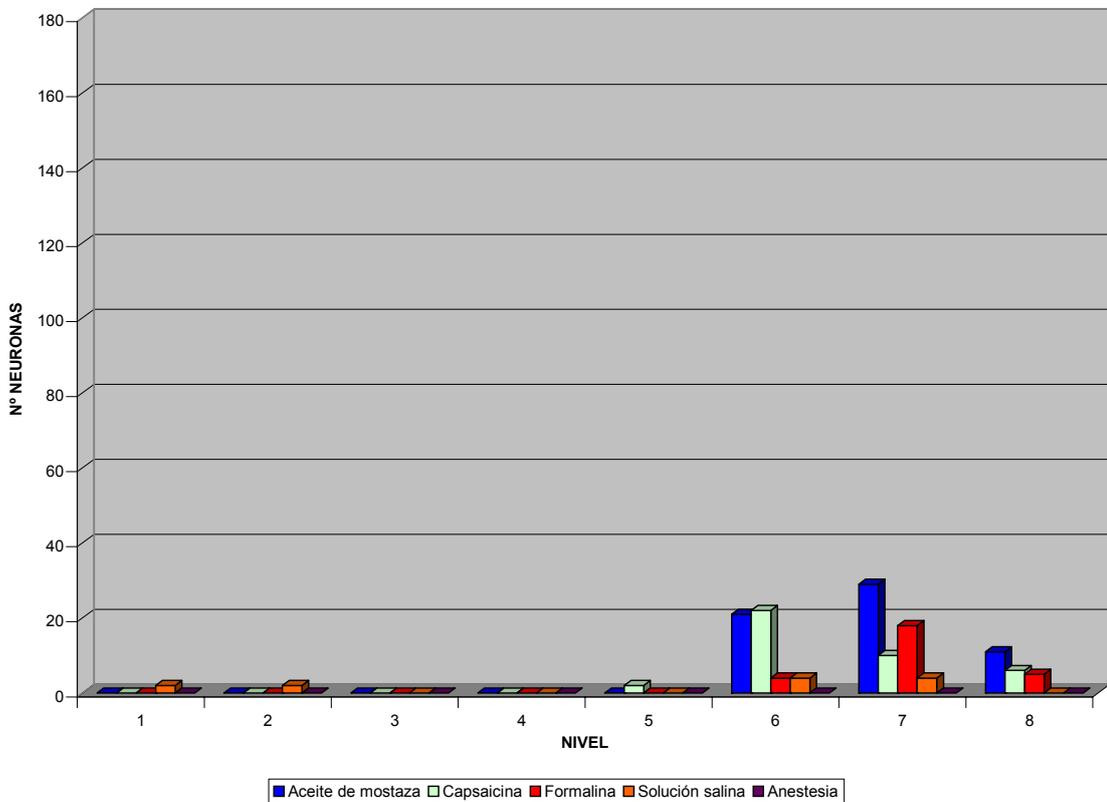
Hist. 15. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral.



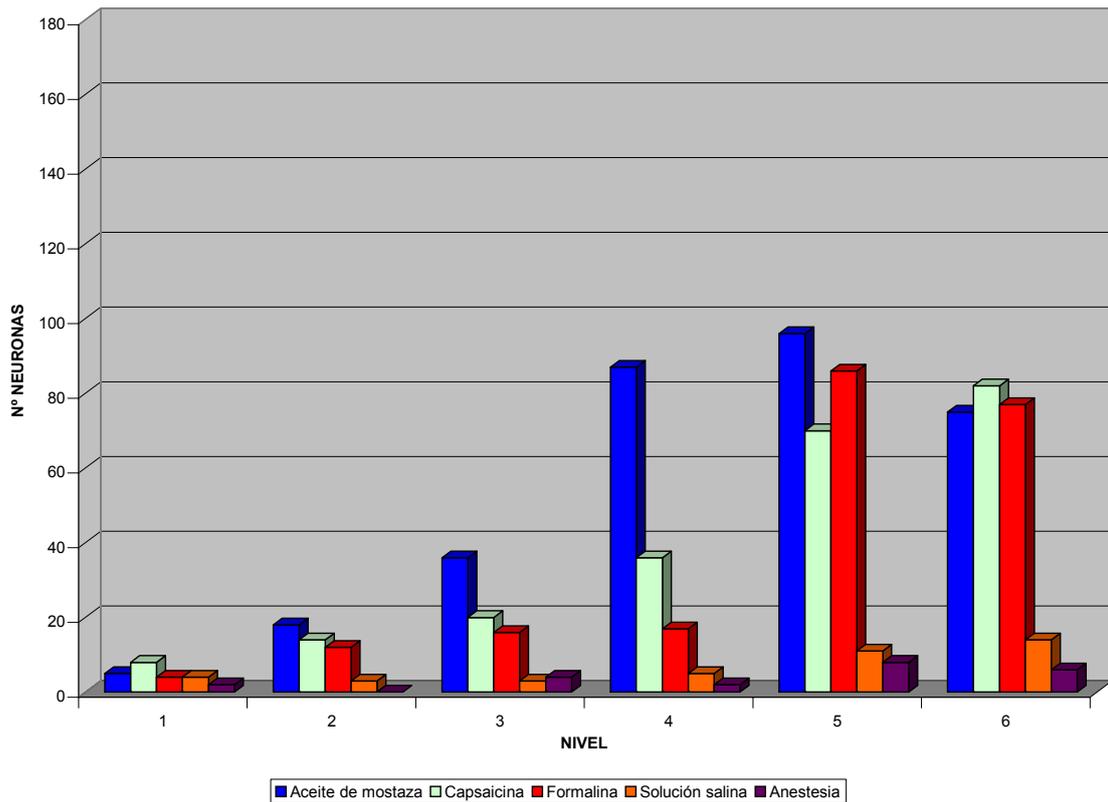
Hist. 16. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal ventral ipsilateral.



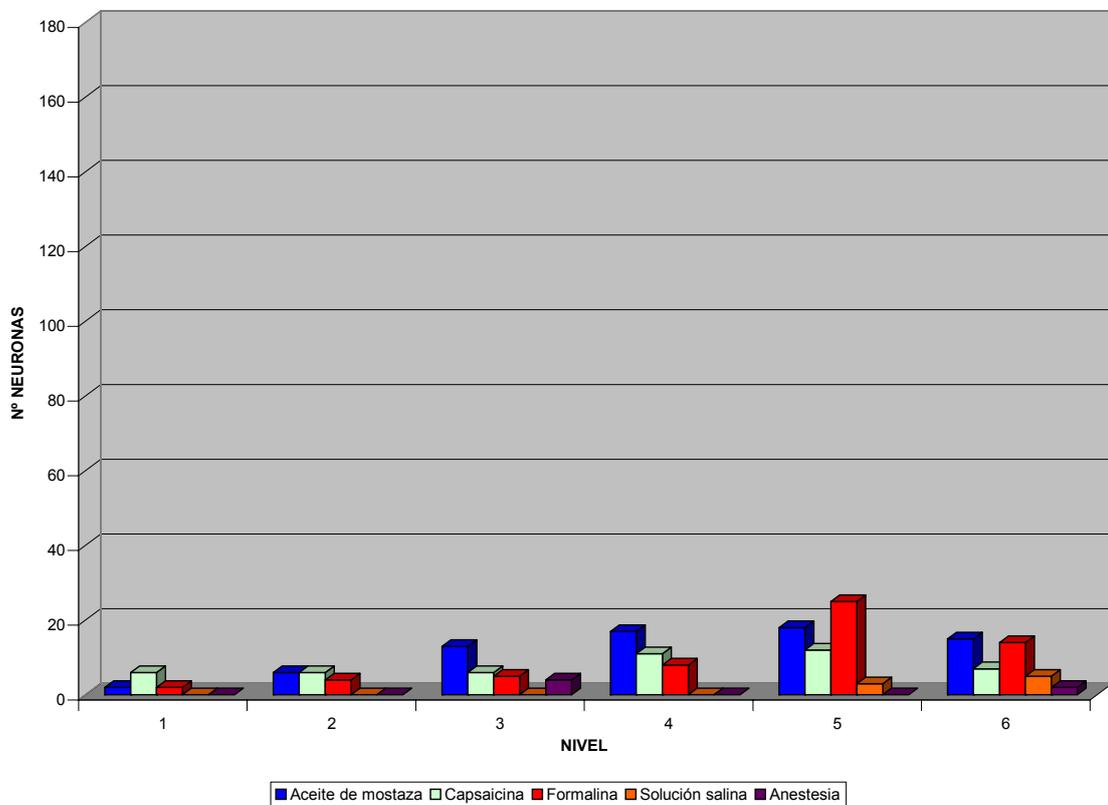
Hist. 17. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral.



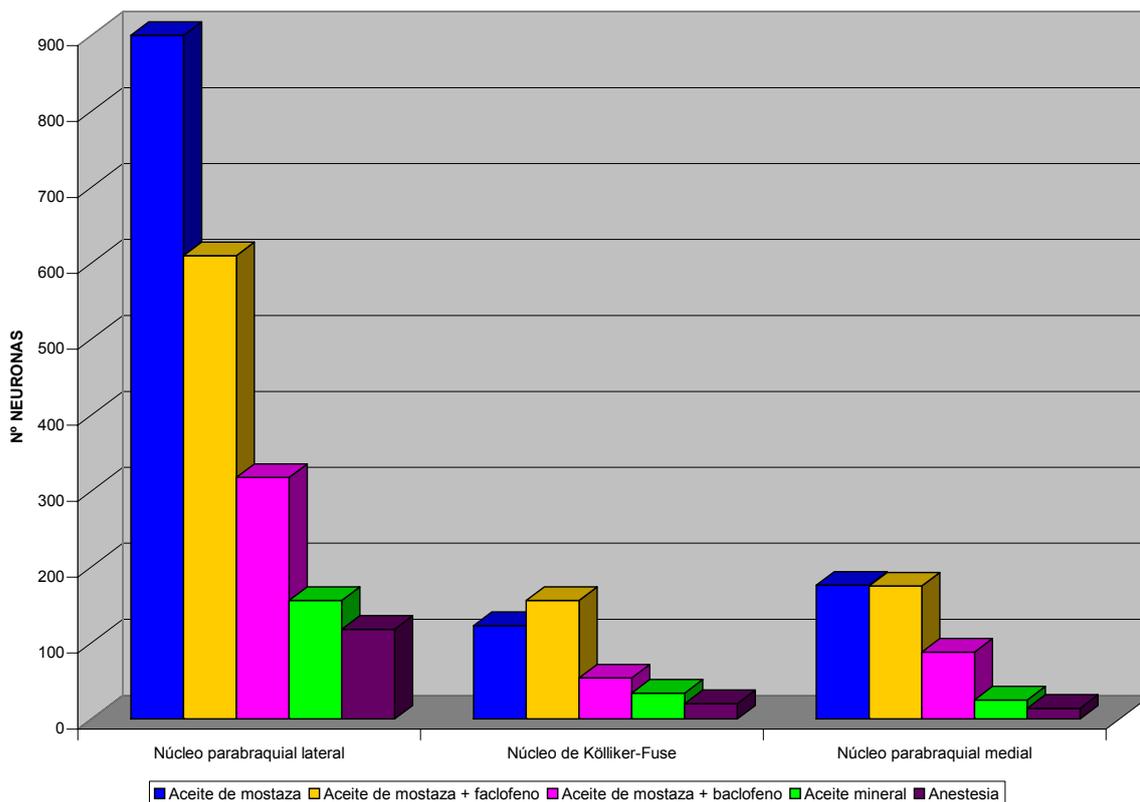
Hist. 18. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal rostral ipsilateral.



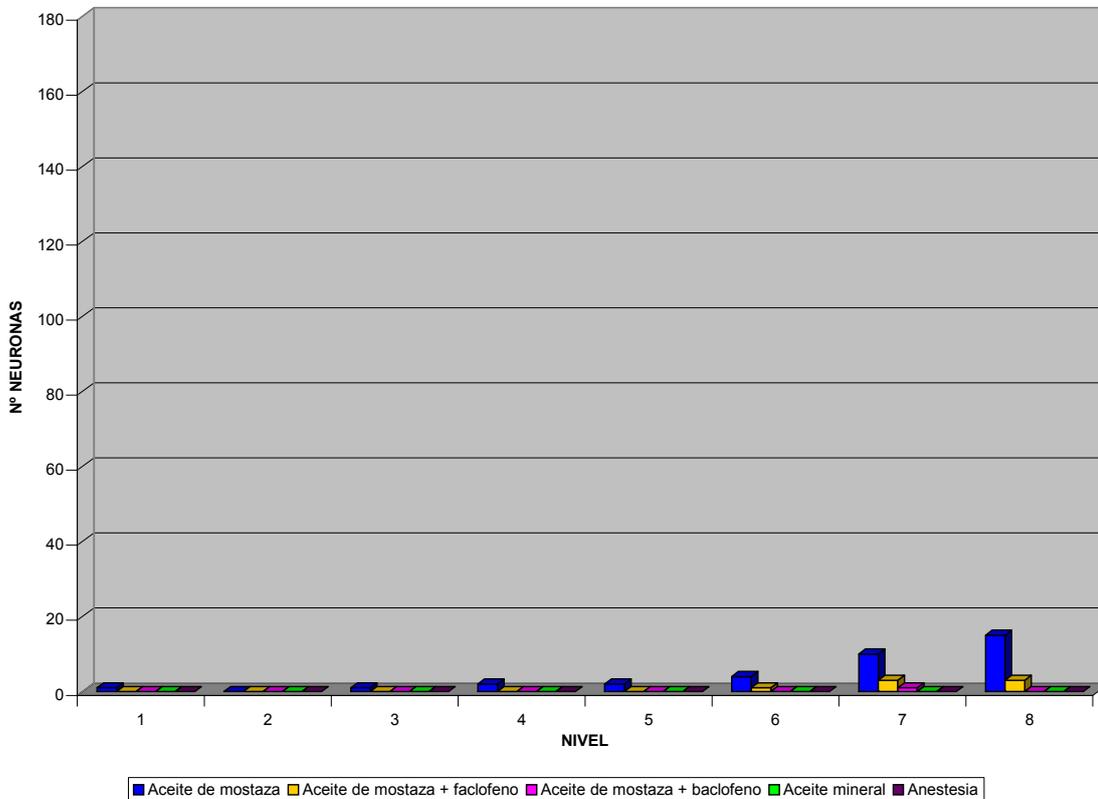
Hist. 19. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal ventral ipsilateral.



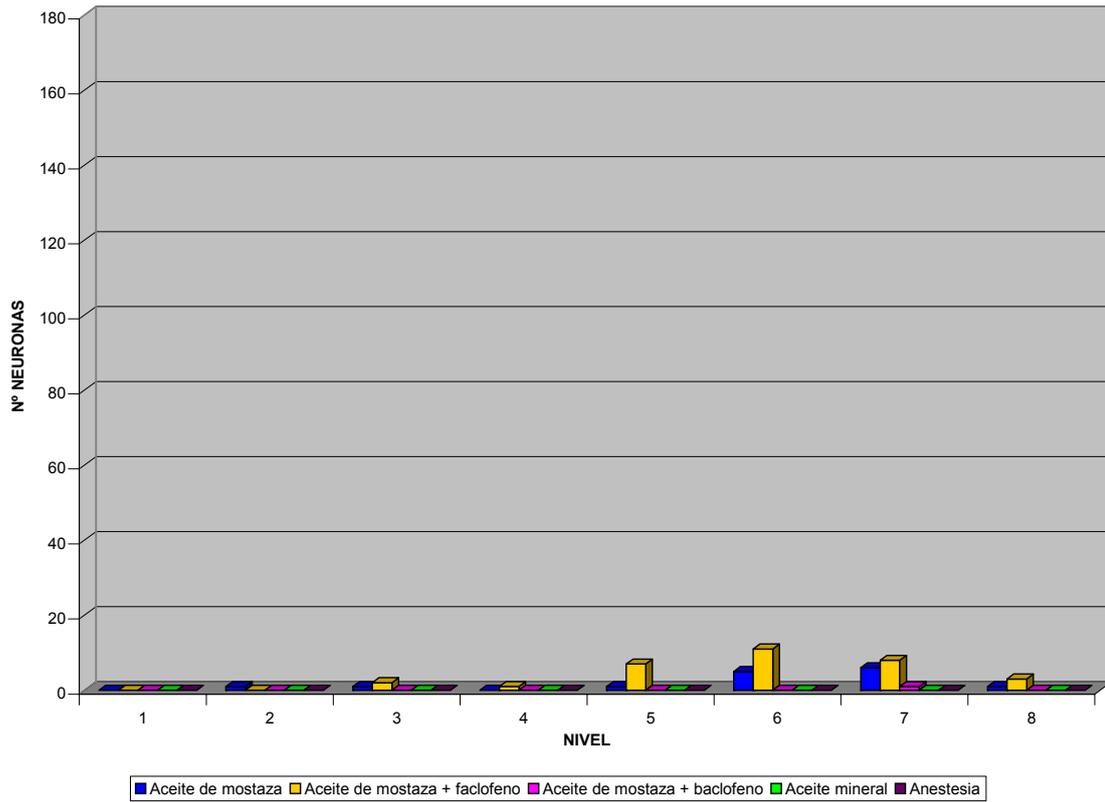
Hist. 20. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal dorsal ipsilateral.



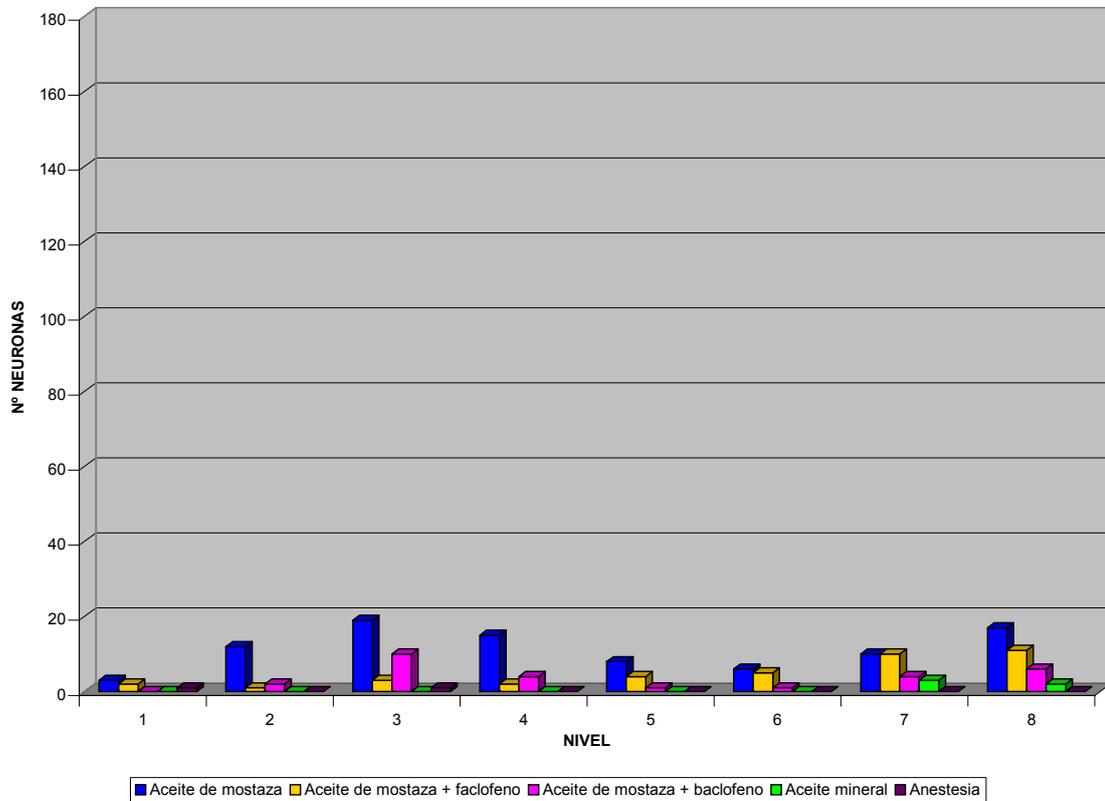
Hist. 21. Número de neuronas c-fos positivas en el complejo parabraquial ipsilateral.



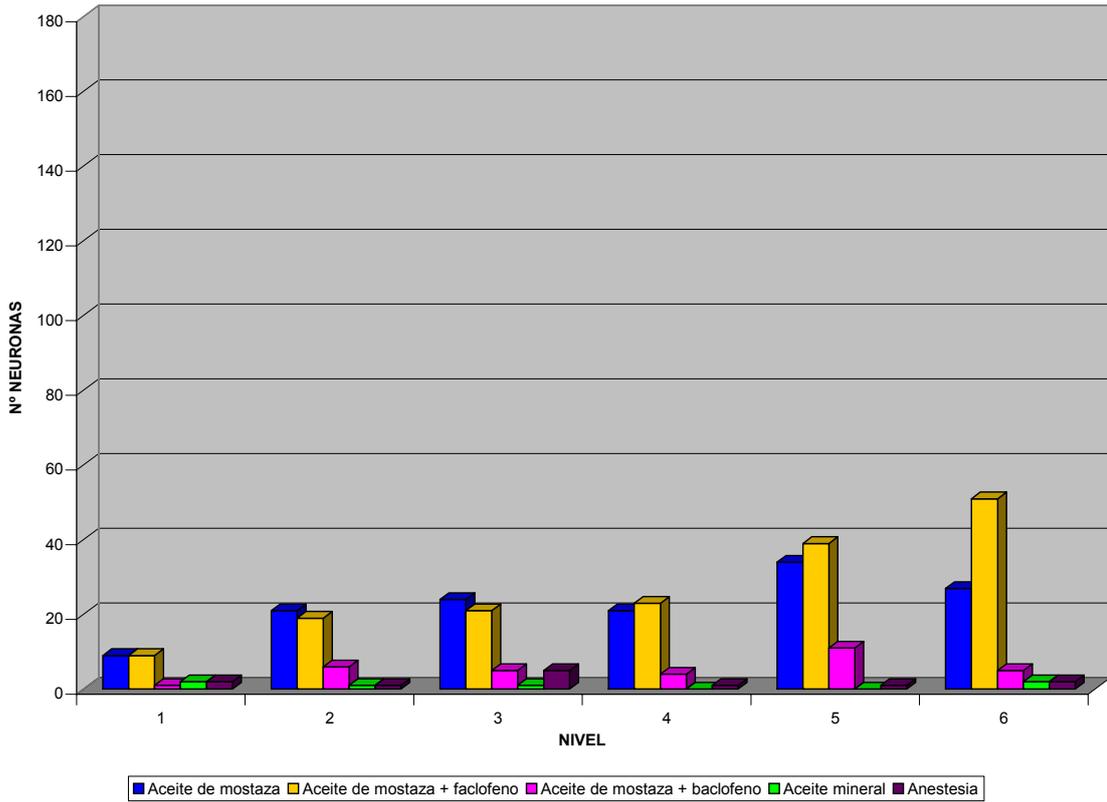
Hist. 22. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral ventral contralateral.



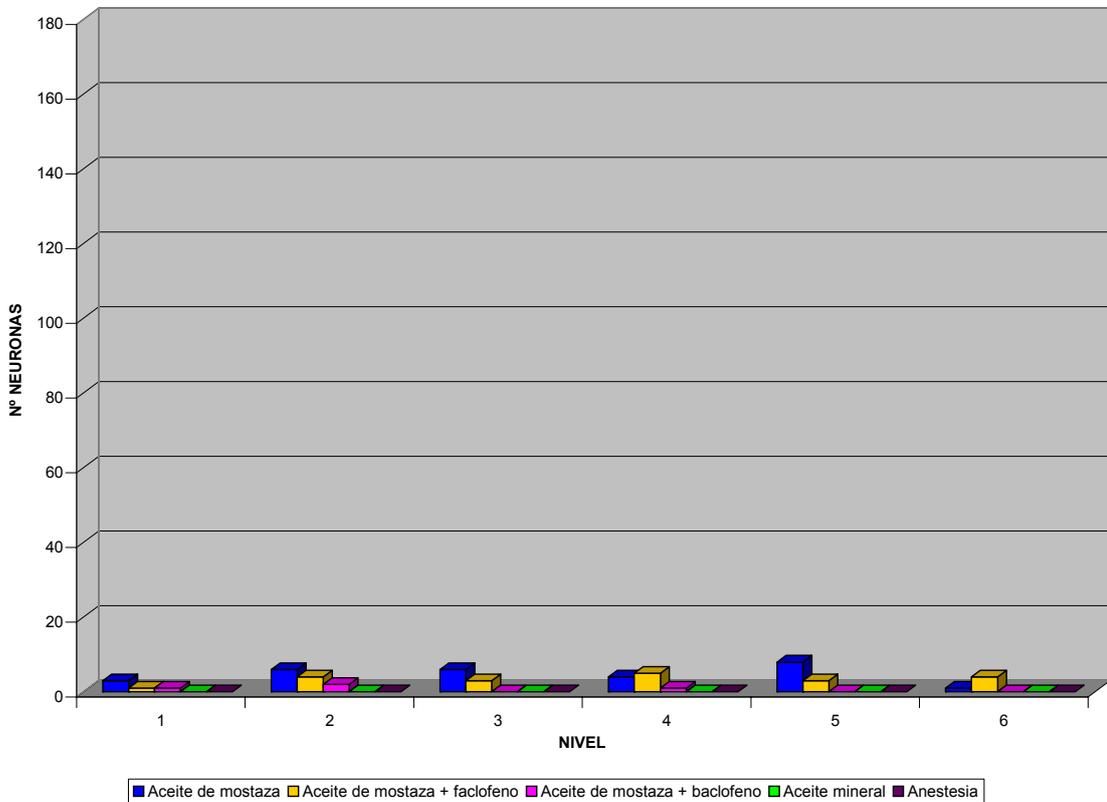
Hist. 23. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo oral dorsal contralateral.



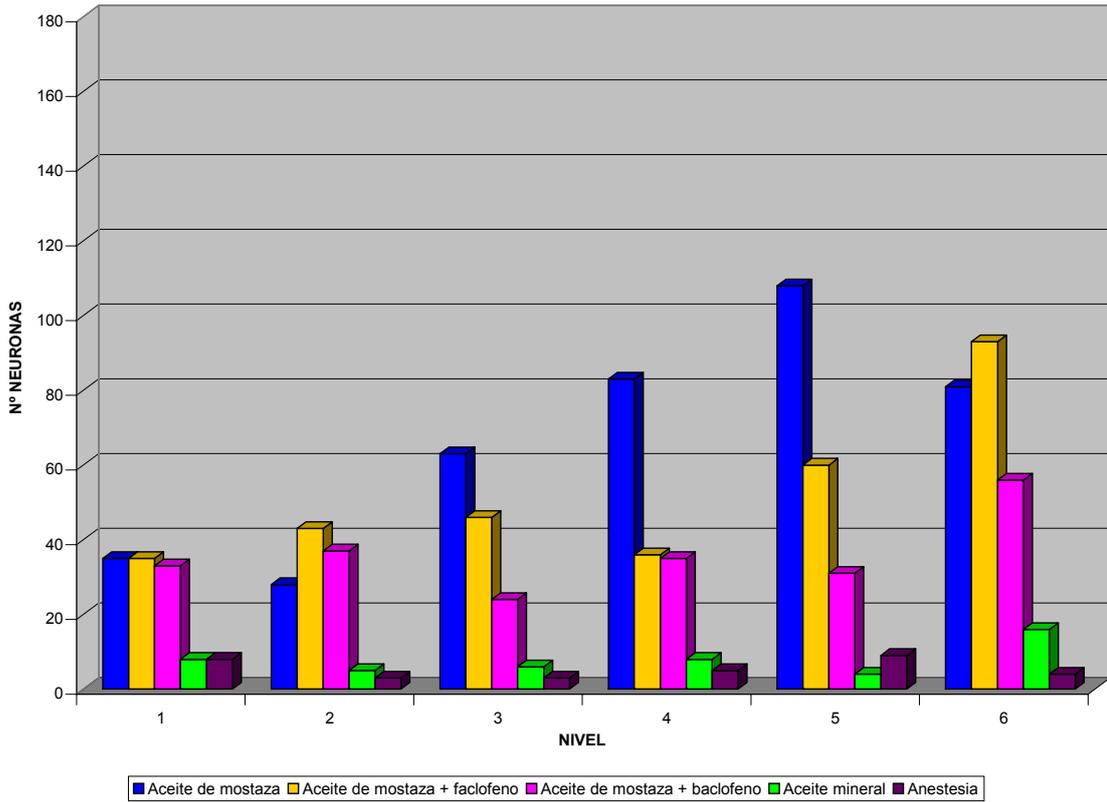
Hist. 24. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en la formación reticular ventral adyacente al núcleo oral contralateral.



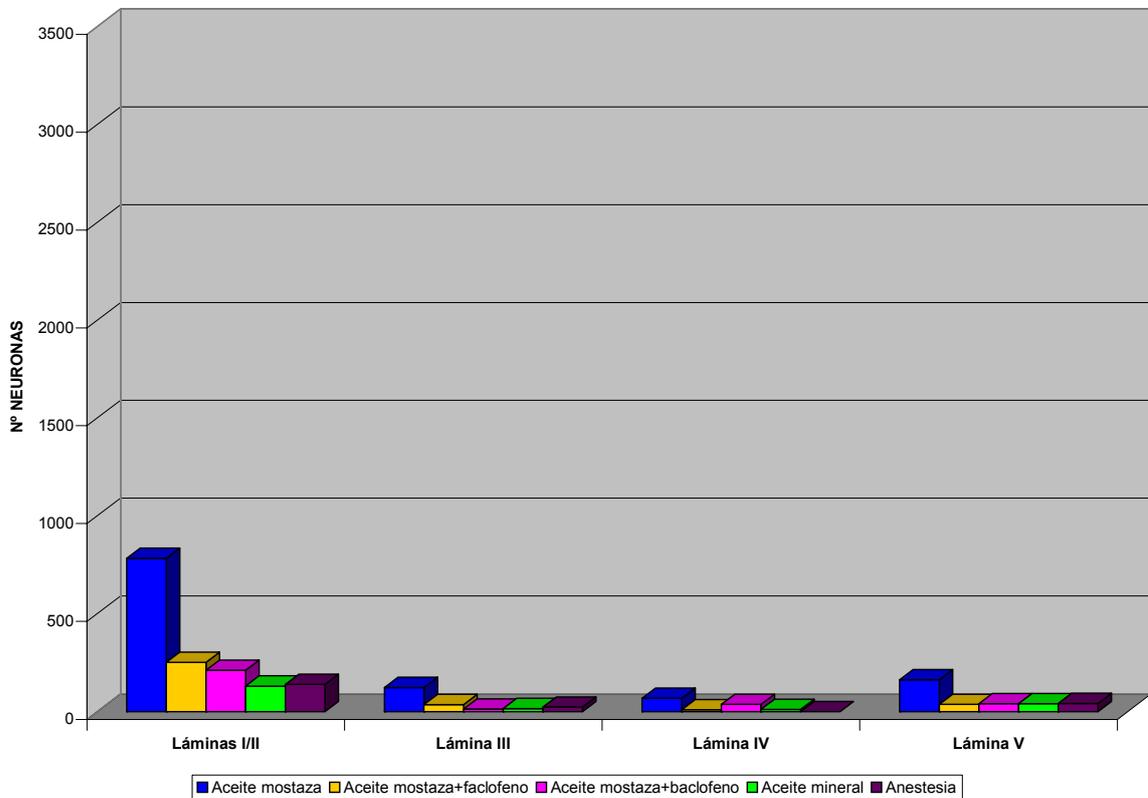
Hist. 25. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpeduncular ventral contralateral.



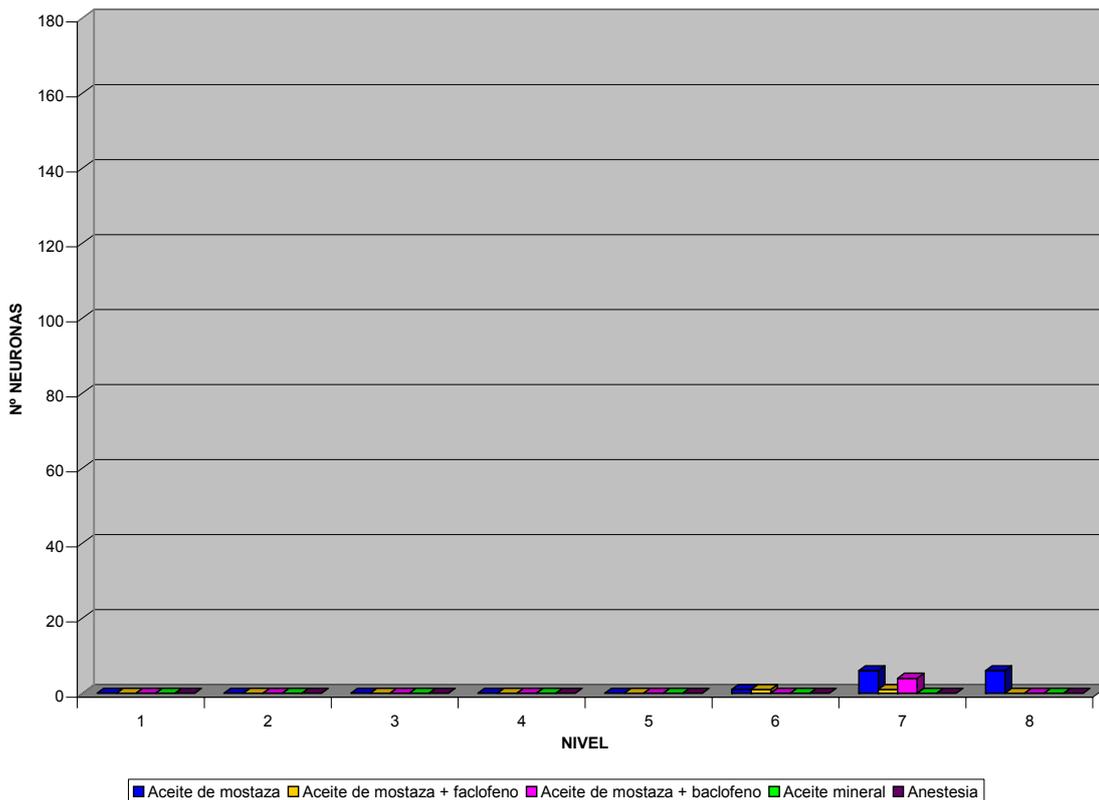
Hist. 26. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo interpeduncular dorsal contralateral.



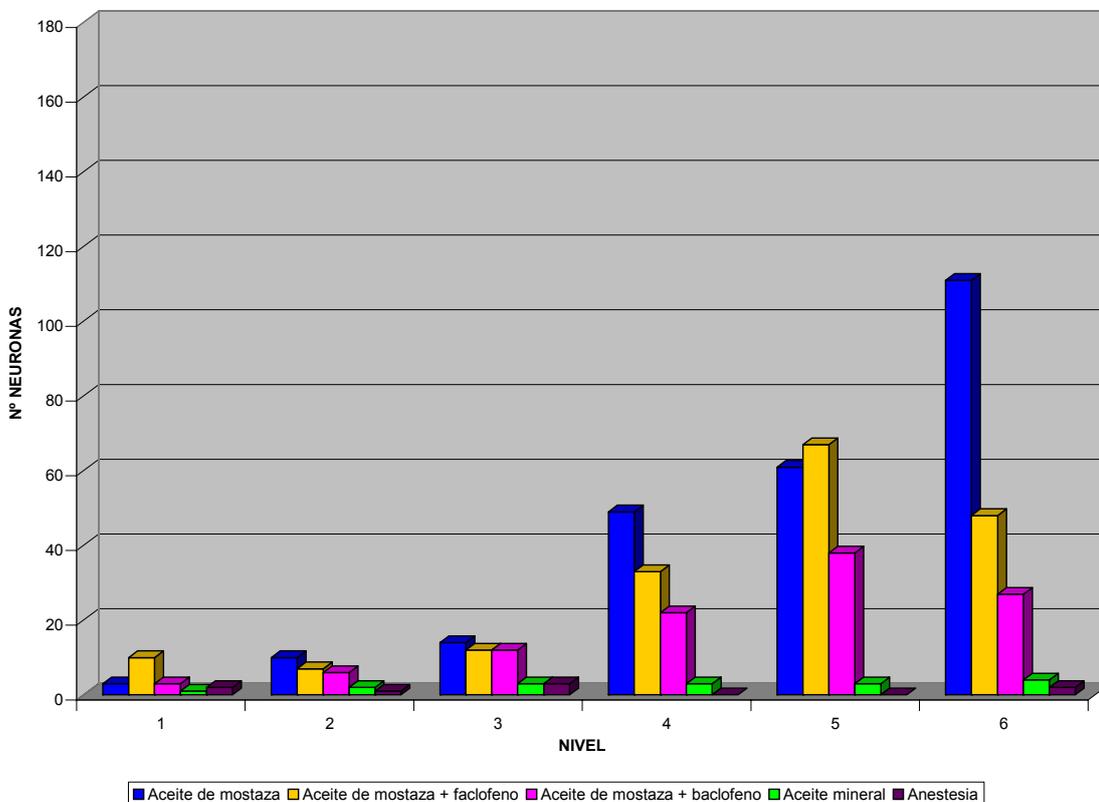
Hist. 27. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en la formación reticular ventral adyacente al núcleo interpolar contralateral.



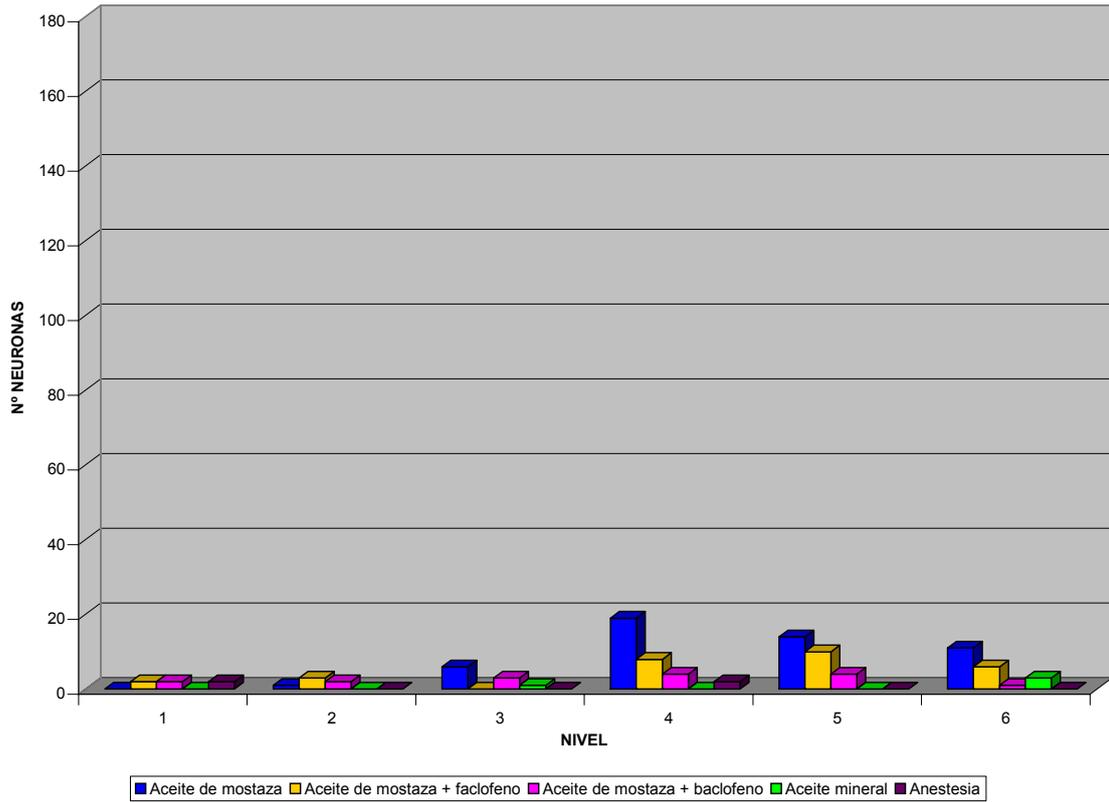
Hist. 28. Número de neuronas c-fos positivas en el núcleo caudal y primer segmento cervical contralaterales.



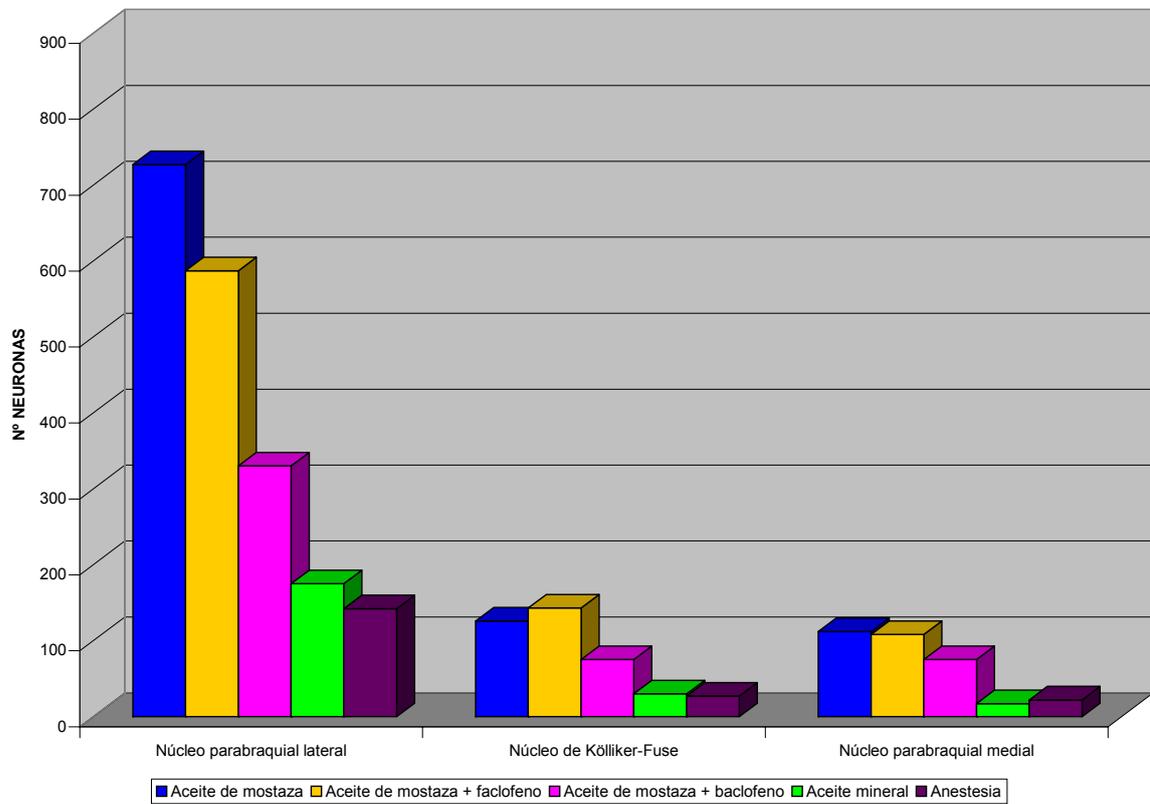
Hist. 29. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal rostral contralateral.



Hist. 30. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal ventral contralateral.



Hist. 31. Distribución rostrocaudal de las neuronas c-fos positivas en el núcleo paratrigeminal dorsal contralateral.



Hist. 32. Número de neuronas c-fos positivas en el complejo parabraquial contralateral.

8. Iconografía



ABREVIATURAS

ap - Área postrema
bc - *Brachium conjunctivum*
cc - Canal central
ctz - Cuerpo trapezoide
flm - Fascículo longitudinal medial
frv - Formación reticular ventral
fsol - Fascículo solitario
I-II - Láminas I y II del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
I-IIo - Láminas I y IIo del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
II - Lámina II del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
Iii - Lámina Iii del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
III - Lámina III del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
IV - Lámina IV del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
na - Núcleo ambiguo
ncd - Núcleo coclear dorsal
nph - Núcleo *prepositus* del hipogloso
nrl - Núcleo reticular lateral
nsol - Núcleo del fascículo solitario
nVI - Núcleo abducens
nvl - Núcleo vestibular lateral
nvm - Núcleo vestibular medial
nXII - Núcleo motor del hipogloso
oli - Oliva inferior
ols - Oliva superior
pble - Núcleo parabraquial lateral externo
pbme - Núcleo parabraquial medial externo
pci - Pedúnculo cerebeloso inferior
pcm - Pedúnculo cerebeloso medio
pi - Pirámide
pVd - Núcleo paratrigeminal dorsal
pVv - Núcleo paratrigeminal ventral
raVII - Raíz del nervio facial
rd - Raíces dorsales de C1
rVII - Rodilla del nervio facial
V - Lámina V del núcleo caudal del trigémino o médula espinal
Vi - Núcleo interpolar del trigémino
Vid - Núcleo interpolar dorsal
VII mot - Núcleo motor del facial
Viv - Núcleo interpolar ventral
Vmot - Núcleo motor del trigémino
Vmr - Raíces motoras del trigémino
Vod - Núcleo oral dorsal
Vov - Núcleo oral ventral
Vpd - Núcleo principal dorsal
Vpv - Núcleo principal ventral
Vtr - Tracto espinal trigeminal

Fig. 1. Inmunorreactividad de CGRP (A,B,D,E) y sustancia P (C) en el complejo parabraquial (A,B) y en el núcleo principal del trigémino ipsilaterales. **A:** Las fibras CGRP positivas se localizan en el tercio caudal de la región parabraquial medial, especialmente en el núcleo parabraquial medial externo. Obsérvese la moderada positividad para CGRP presente en las motoneuronas del núcleo motor del trigémino. **B:** Microfotografía a grandes aumentos de las fibras CGRP positivas del núcleo parabraquial medial externo mostradas en la Fig. 1A. **C-D:** Las fibras sustancia P (C) y CGRP (D) positivas se hallan en la región dorsolateral del subnúcleo principal dorsal en su tercio rostral. Obsérvese la moderada positividad para CGRP presente en las motoneuronas del núcleo motor del trigémino. **E:** Microfotografía a grandes aumentos de los fascículos de fibras CGRP positivas presentes en la región dorsolateral del subnúcleo principal dorsal mostradas en la Fig. 1D. Barra = 200 μ m.

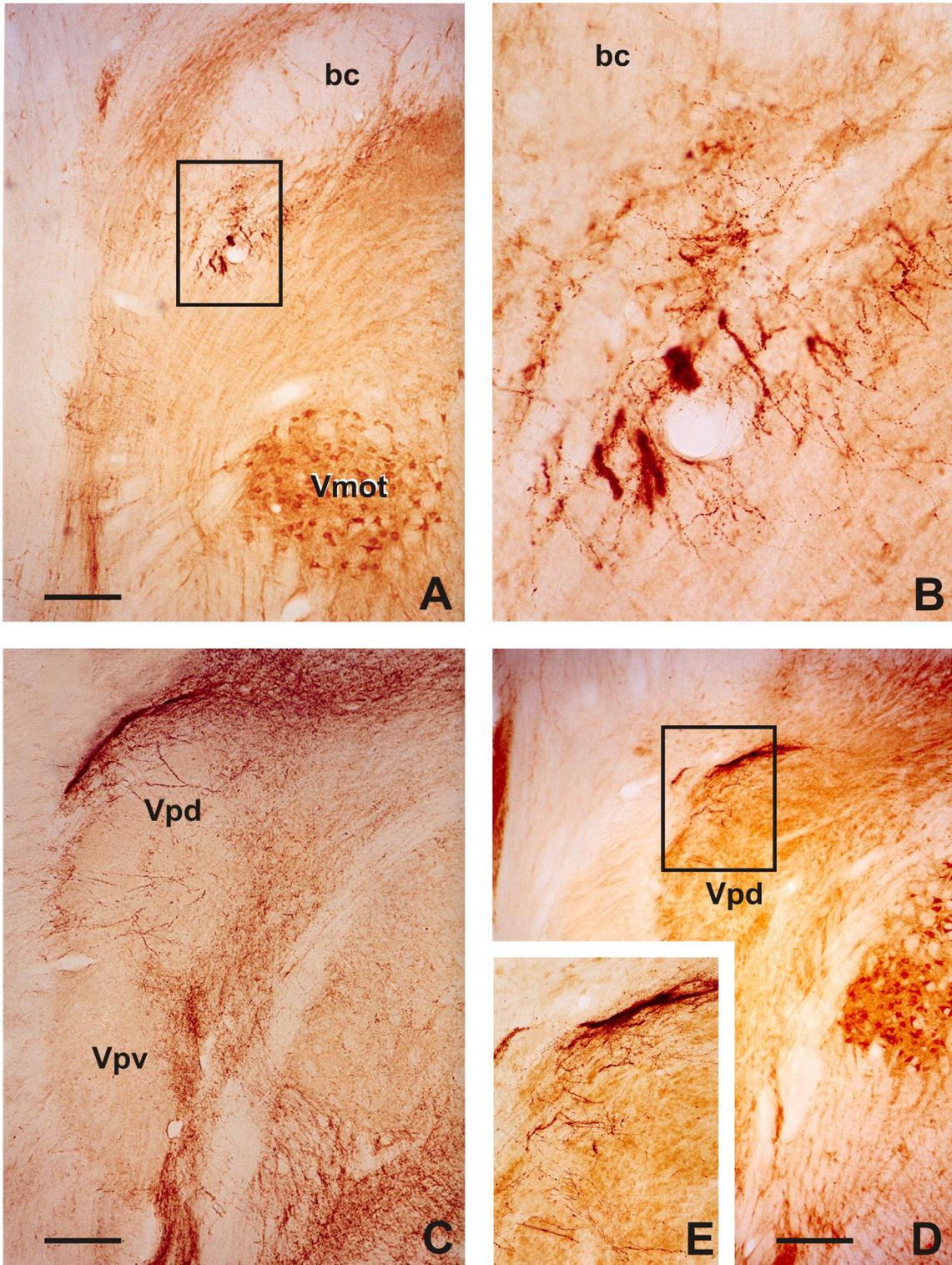


Fig. 1

Fig. 2. Inmunorreactividad de sustancia P (A,B) y CGRP (C,D) en el núcleo oral del trigémino ipsilateral. **A-B:** Imágenes en campo claro (A) y campo oscuro (B) en las que se observan fibras sustancia P positivas localizadas en el límite marginal del núcleo oral ventral (flechas) y dorsal en su tercio medio. **C-D:** Las fibras CGRP positivas después de atravesar el tracto espinal trigeminal alcanzan la división dorsal del núcleo oral y, en menor medida también, su división ventral, tanto en el tercio medio (C) como en el tercio caudal (D) del núcleo oral. La gran mayoría de las fibras CGRP positivas proyectan a la región lateral del núcleo oral, aunque también es posible observar algunas fibras formando pequeños acúmulos de proyección terminal dentro del tracto espinal trigeminal (flechas). Obsérvese la inmunorreactividad de CGRP presente en las motoneuronas del núcleo motor del facial (C). Barra = 200 μ m.

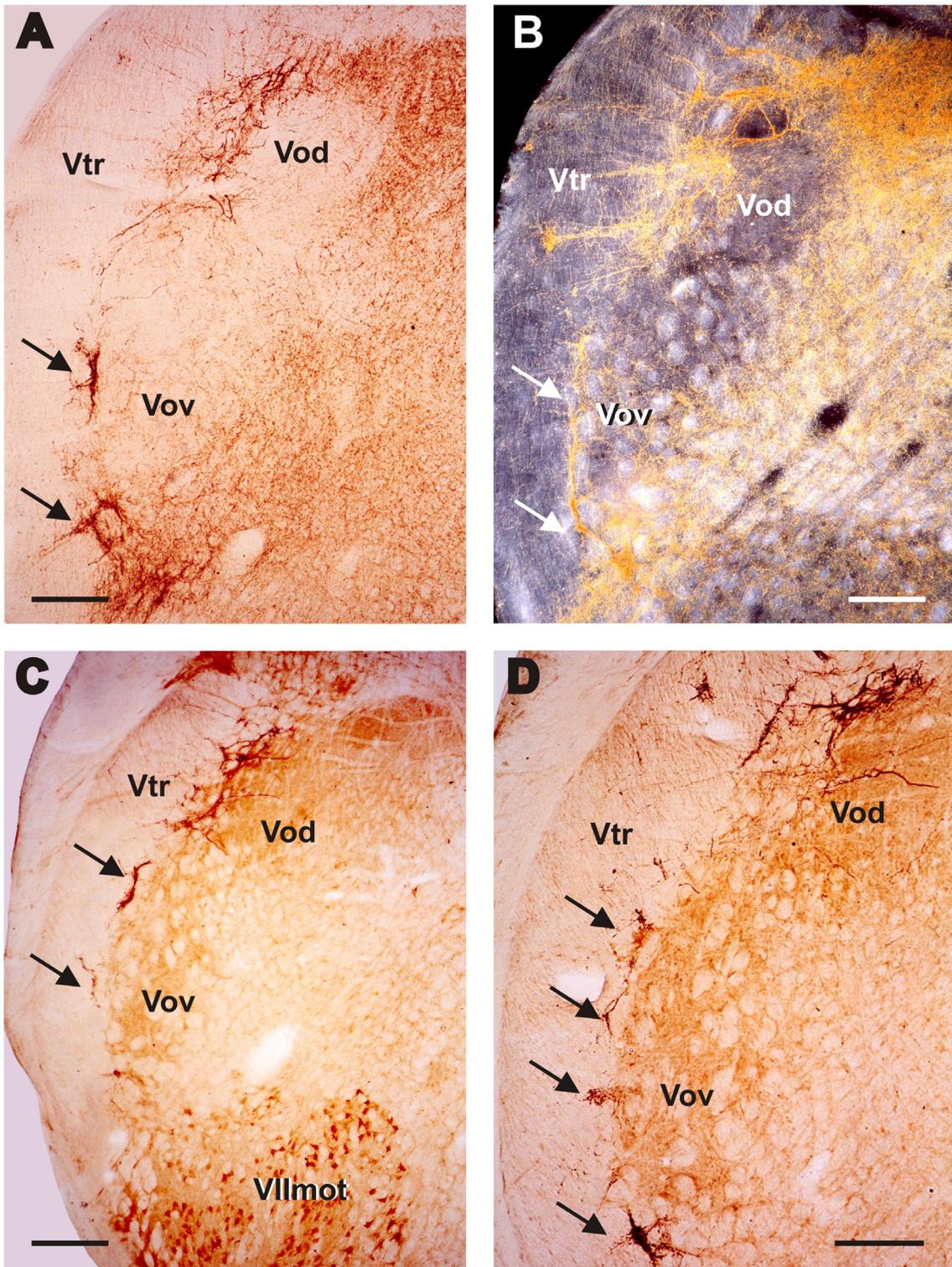


Fig. 2

Fig. 3. Inmunorreactividad para CGRP a la altura del tercio medio del núcleo interpolar del trigémino ipsilateral. **A:** Las fibras CGRP positivas se observan en el núcleo paratrigeminal dorsal, en el núcleo interpolar ventral y en el núcleo del fascículo solitario. **B:** Microfotografía a grandes aumentos de la densa proyección de fascículos de fibras con inmunorreactividad de CGRP que alcanzan el núcleo paratrigeminal dorsal. **C:** Microfotografía a grandes aumentos de las fibras CGRP positivas que proyectan al núcleo interpolar ventral, principalmente a la región ventromedial del mismo. **D:** Microfotografía a grandes aumentos de los haces de fibras con inmunorreactividad para CGRP que alcanzan el núcleo del fascículo solitario. Barra = 200 μm .

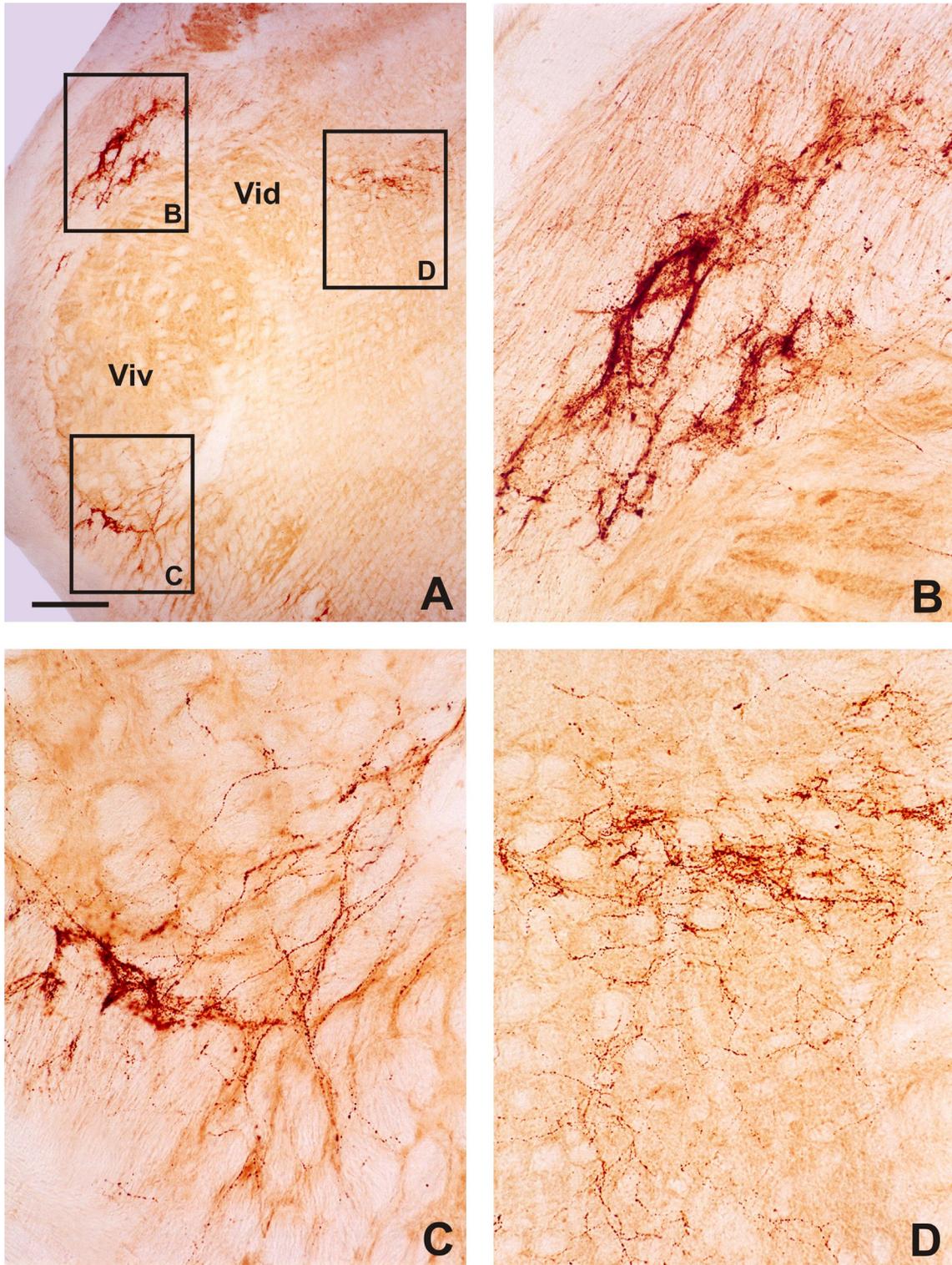


Fig. 3

Fig. 4. Inmunorreactividad de CGRP en el núcleo interpolar (A-C) y en el núcleo caudal del trigémino (D-E) ipsilaterales. **A:** Las fibras CGRP positivas situadas medialmente al subnúcleo ventral del núcleo interpolar rostral discurren hacia la formación reticular lateral ventral. **B:** Microfotografía a grandes aumentos de las fibras con inmunorreactividad para CGRP de la formación reticular lateral ventral mostradas en la Fig. 4A. **C:** Intensa inmunorreactividad para CGRP registrada en la región marginal del núcleo interpolar caudal del trigémino, zona considerada como la prolongación rostral de las láminas superficiales del núcleo caudal. **D:** Las fibras CGRP positivas están localizadas en el núcleo paratrigeminal ventral y en las láminas I y IIo del núcleo caudal, a la altura de la transición del núcleo interpolar con el núcleo caudal del trigémino. **E:** Numerosas fibras con inmunorreactividad para CGRP halladas en las láminas I y IIo del tercio medio del núcleo caudal del trigémino. Algunas fibras atraviesan las láminas III y IV para alcanzar, en forma de arborizaciones terminales, la región de transición entre las láminas IV y V (flecha). Barra = 200 μ m.

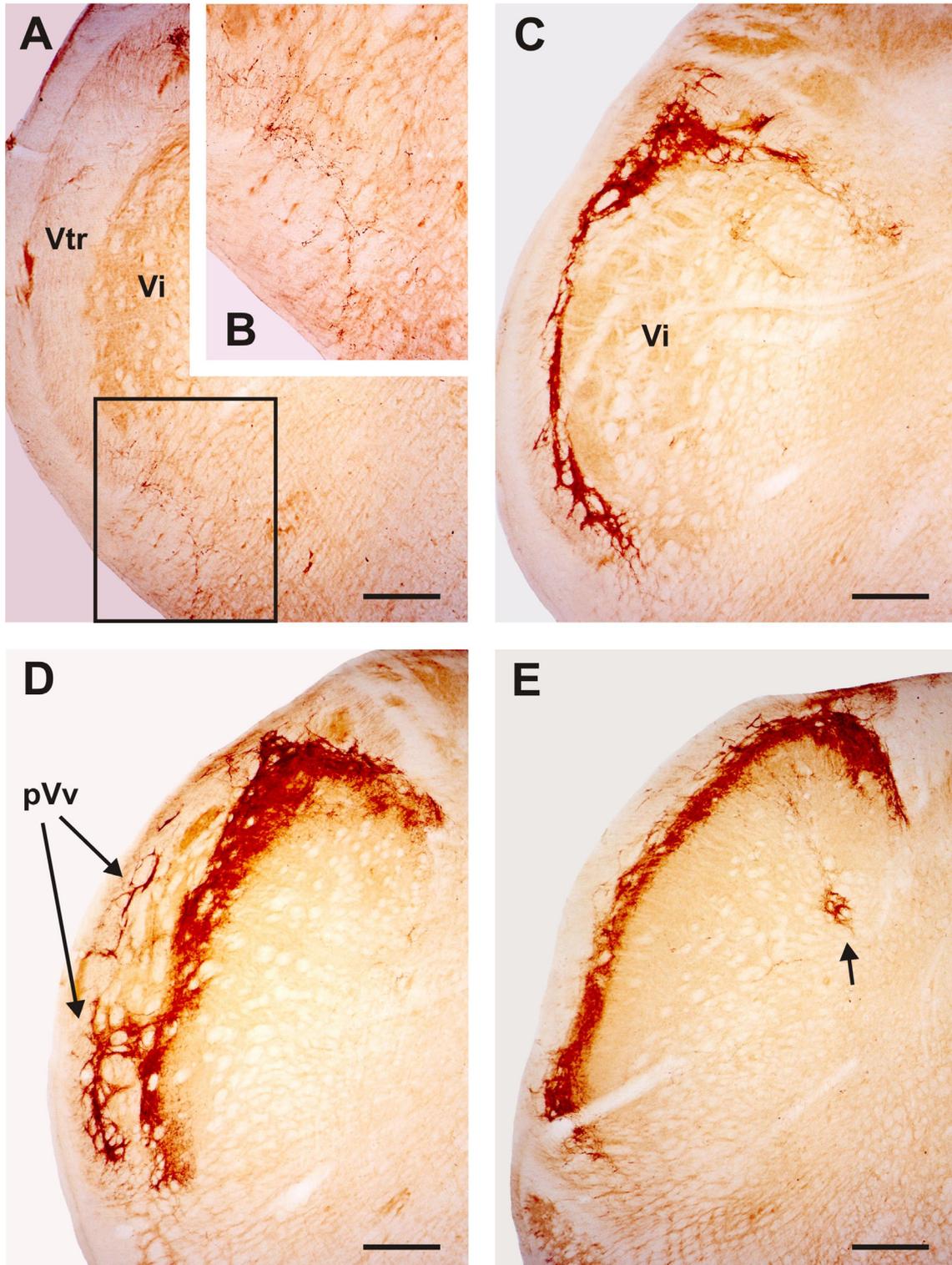


Fig. 4

Fig. 5. Inmunorreactividad para sustancia P (A,B) y CGRP (C,D) en la transición del núcleo caudal del trigémino con el primer segmento cervical ipsilateral. **A-B:** Microfotografías de campo claro (A) y campo oscuro (B) en las que se registra una intensa positividad para sustancia P en las láminas I-IIo de la región de transición del núcleo caudal con el primer segmento cervical. Igualmente, destaca la proyección de fibras que alcanzan la lámina III y especialmente la lámina V. Obsérvese la presencia de numerosas fibras sustancia P positivas en el núcleo espinal lateral (A, flecha). **C-D:** Microfotografías de campo claro (C) y campo oscuro (D) que muestran una muy densa proyección de fibras CGRP positivas en las láminas I-IIo de la región de transición del núcleo caudal con el primer segmento cervical. Igualmente, proyecciones aisladas de fibras con positividad para CGRP alcanzan la lámina III y el límite entre las láminas IV y V. Obsérvese la inmunorreactividad para CGRP registrada en algunas motoneuronas del asta ventral (C, flecha). Barra = 200 μ m.

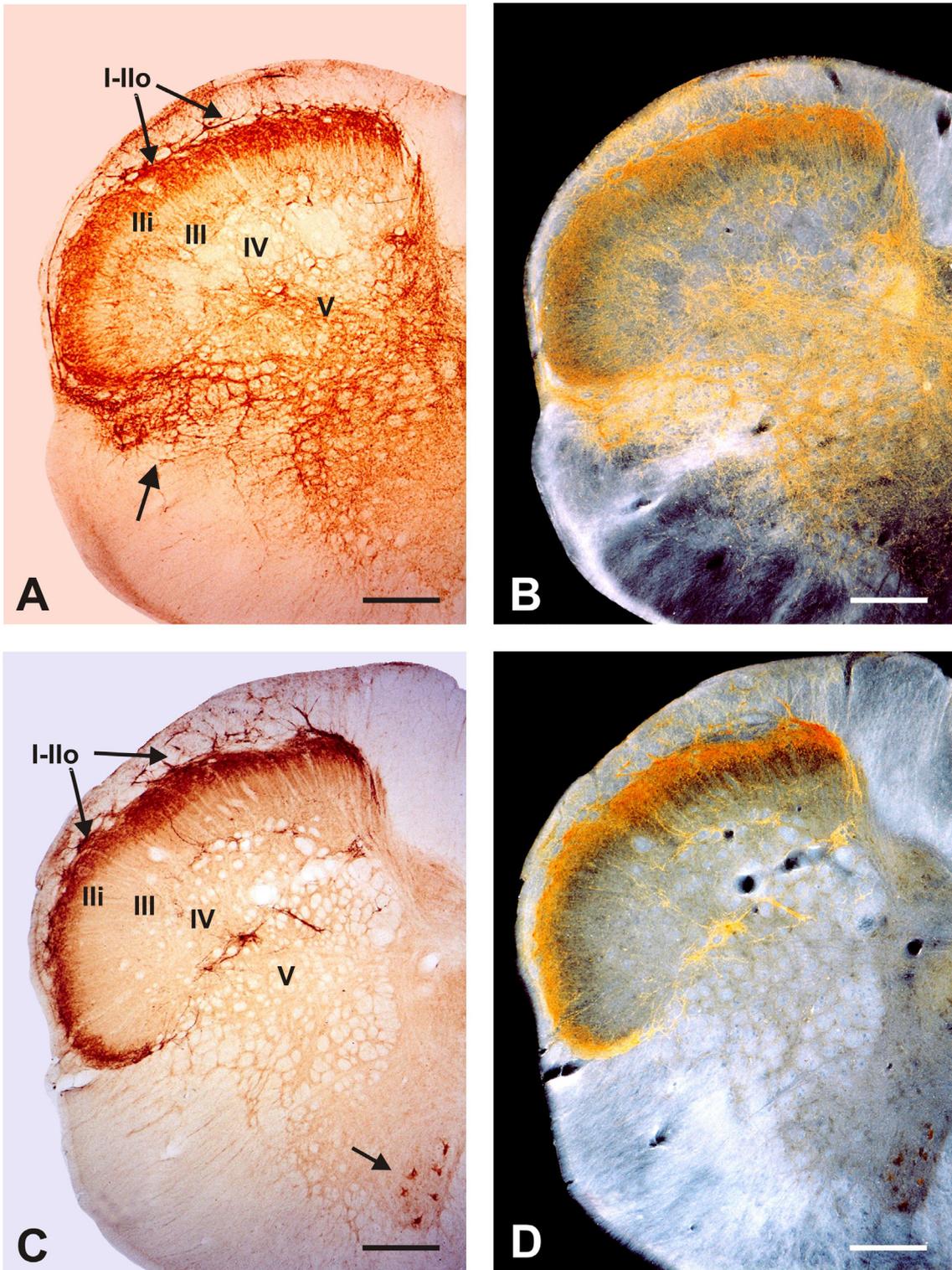


Fig. 5

Fig. 6. Terminales de aferentes primarias trigeminales marcadas con el conjugado CTb-HRP en los núcleos rostrales del complejo nuclear sensitivo del trigémino ipsilateral. El producto de reacción está situado en la región ventrolateral del núcleo principal ventral (A), en la zona lateral del núcleo oral ventral (B,C) y en la zona media del núcleo interpolar del trigémino (D). Barra = 200 μm .

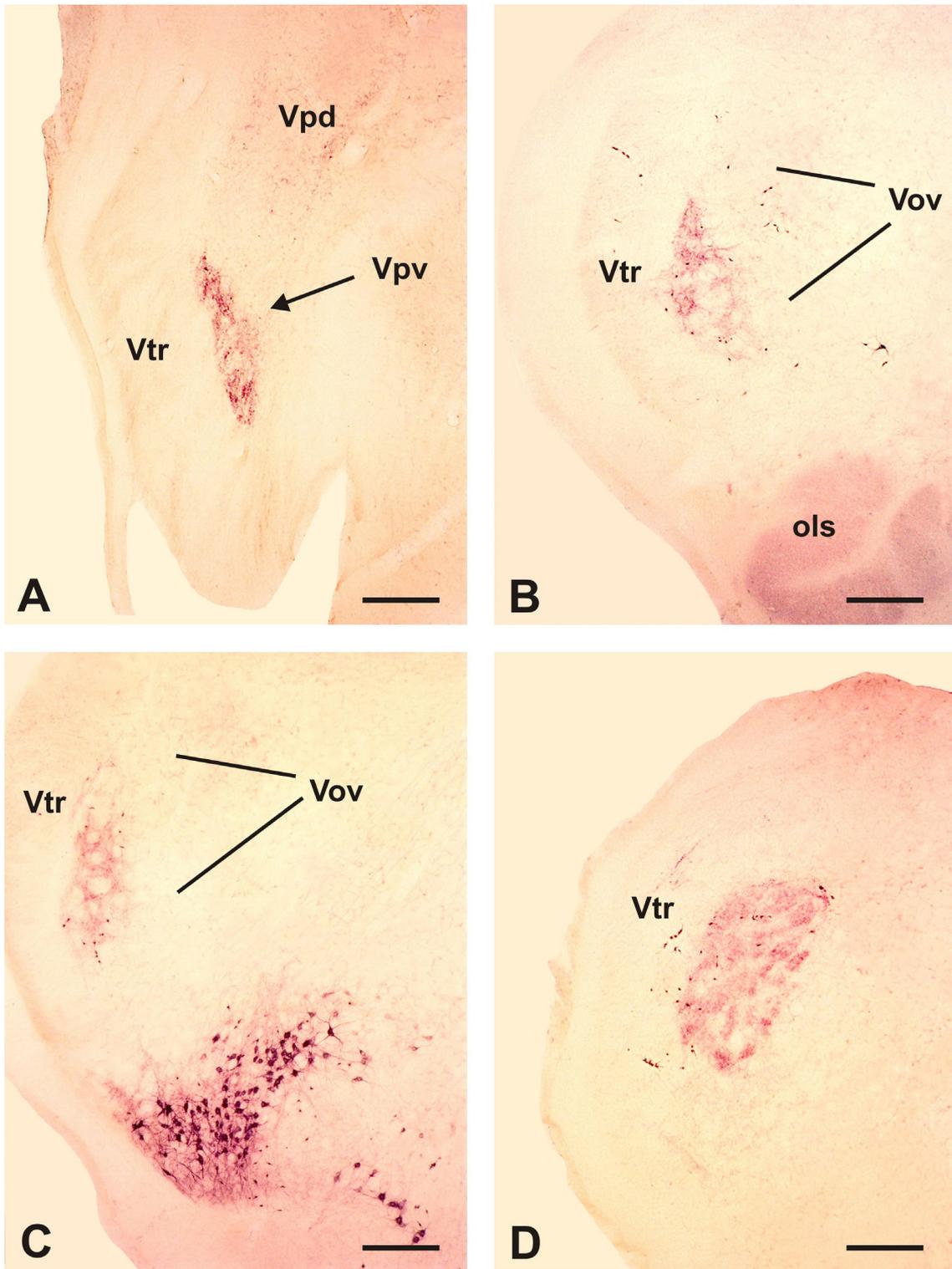


Fig. 6

Fig. 7. Terminales de aferentes primarias trigeminales marcadas con los conjugados CTb-HRP (A-C) e IB4-HRP (D,E) en el núcleo espinal del trigémino ipsilateral. **A-C:** El producto de reacción se observa en los núcleos paratrigeminales dorsal y ventral (A), en toda la extensión de la lámina I y en parte de la lámina II, así como en la zona media de las láminas III-V a la altura del tercio rostral del núcleo caudal del trigémino (B), en toda la extensión de la lámina I y en la zona media de la lámina III a la altura del tercio final del núcleo caudal del trigémino (C). **D-E:** Microfotografías de campo oscuro (D) y campo claro (E) en las que se observa una intensa proyección de fibras de pequeño calibre en la zona media de las láminas I y II a la altura del tercio final del núcleo caudal del trigémino. Barra = 200 μ m.

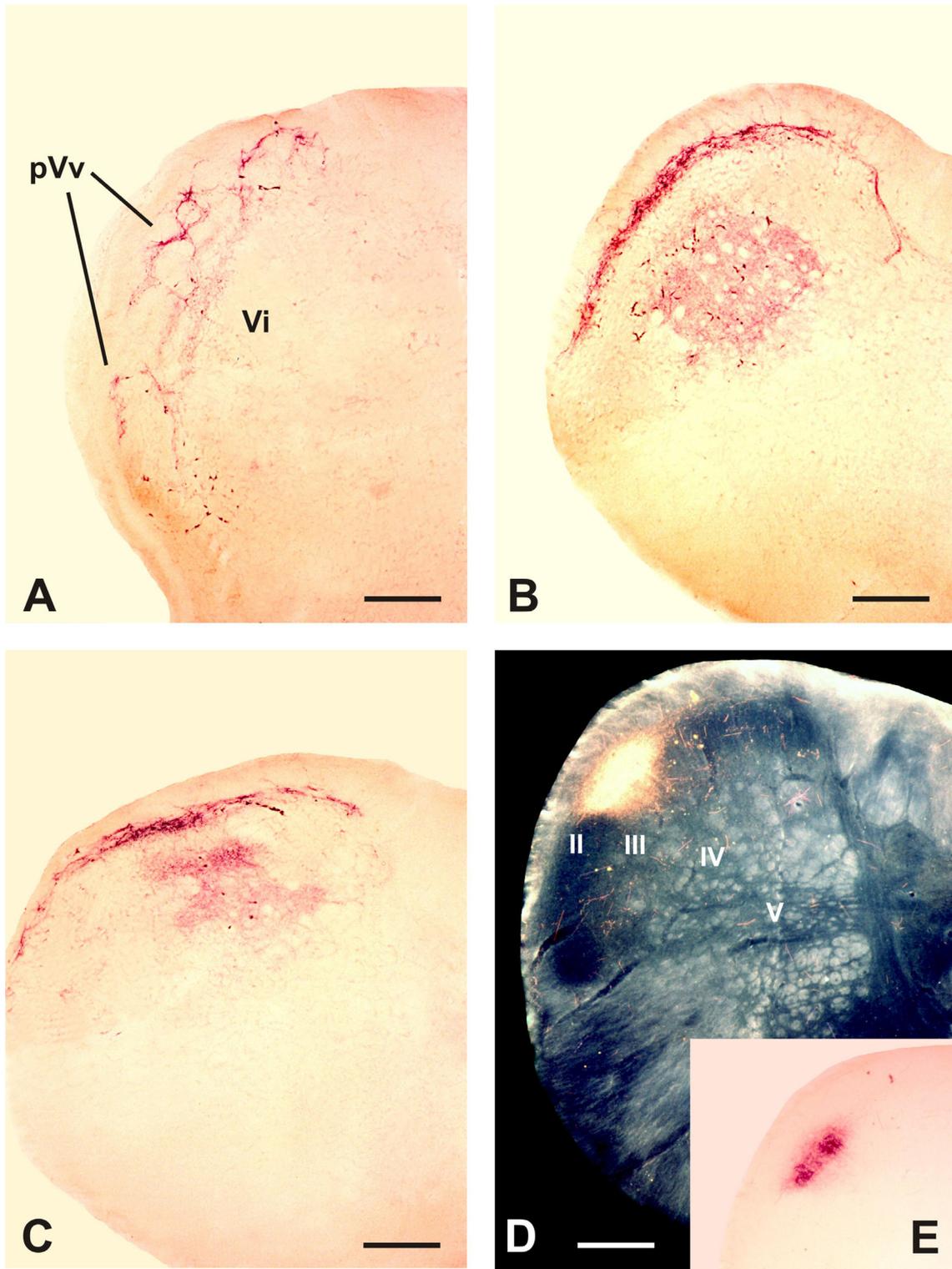


Fig. 7

Fig. 8. Expresión de c-fos en el tercio caudal del complejo parabraquial (A-C) y en el tercio medio del núcleo principal del trigémino (D) tras la inyección de aceite de mostaza previo tratamiento con faclofeno (A-B) y después de la inyección de aceite de mostaza (C-D) en la región de las vibrisas. **A:** Inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial ipsilateral. Las neuronas c-fos positivas se localizan principalmente en el núcleo parabraquial lateral y especialmente en el subnúcleo parabraquial lateral externo. Por el contrario, obsérvese la escasa inmunorreactividad de c-fos presente en el núcleo parabraquial medial y núcleo de Kölliker-Fuse. Barra = 200 μm . **B:** Inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial contralateral. La expresión de c-fos es muy manifiesta en el núcleo parabraquial lateral, núcleo de Kölliker-Fuse y núcleo parabraquial medial. Obsérvese el mayor número de neuronas marcadas en el núcleo parabraquial lateral que en las otras dos formaciones nucleares. Barra = 200 μm . **C:** Inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial ipsilateral. La expresión de c-fos es intensa en el núcleo parabraquial lateral, núcleo de Kölliker-Fuse y núcleo parabraquial medial. Barra = 200 μm . **D:** Inmunorreactividad de c-fos en el núcleo principal del trigémino ipsilateral. Las neuronas c-fos positivas se localizan en la región ventromedial del núcleo principal y en la zona ventrolateral del núcleo intertrigeminal. Barra = 100 μm .

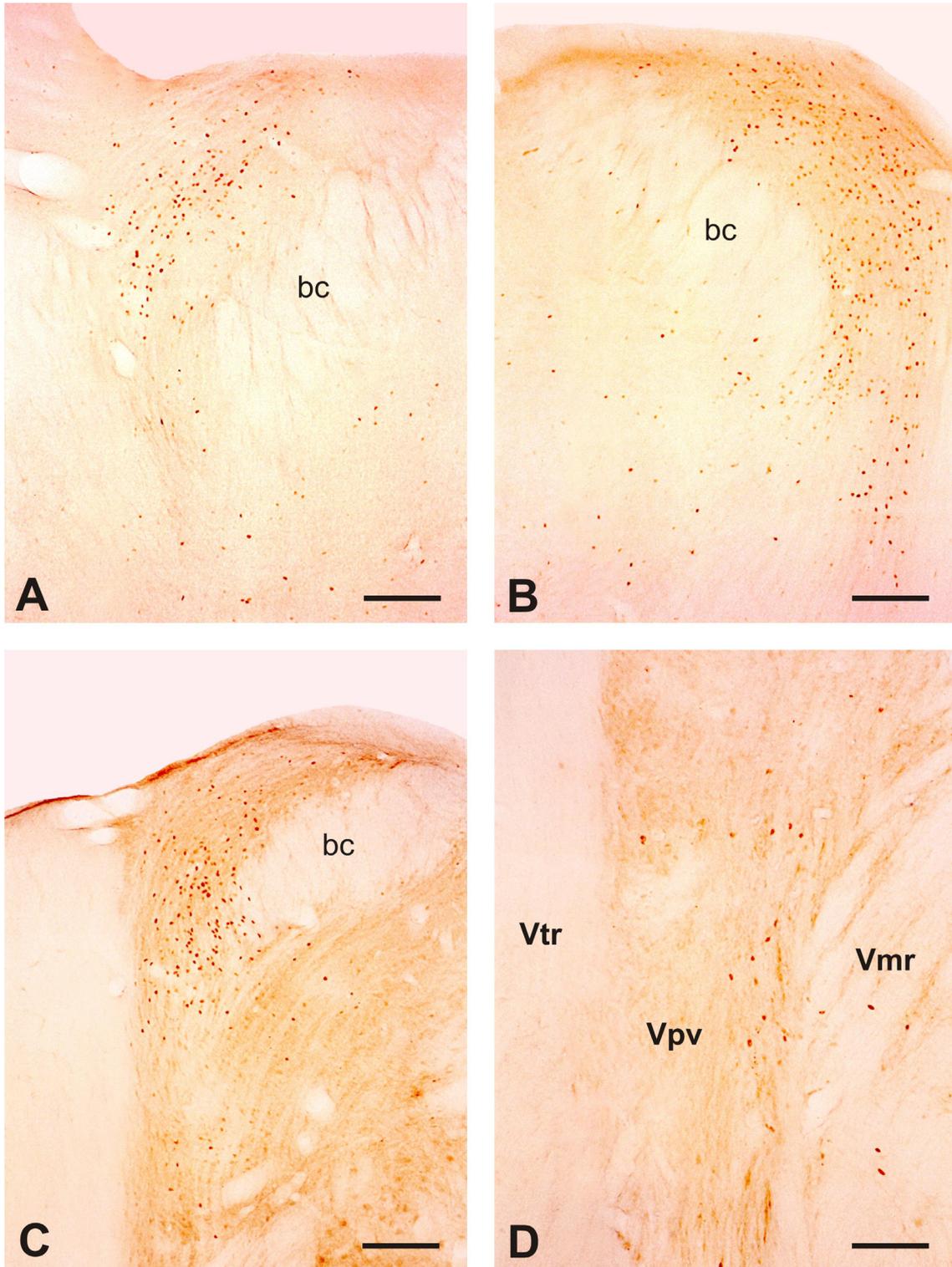


Fig. 8

Fig. 9. Expresión de c-fos en los tercios medio (A) y caudal (B-E) del núcleo oral del trigémino ipsilateral. Las neuronas activadas por la inyección de aceite de mostaza (A-B), formalina (C), capsaicina (D) y aceite de mostaza previo tratamiento con baclofeno (E) se hallan en las regiones ventromedial y ventrolateral del núcleo oral ventral y en la formación reticular adyacente a dicho núcleo. Barra = 200 μm (A) y 100 μm (B-E).

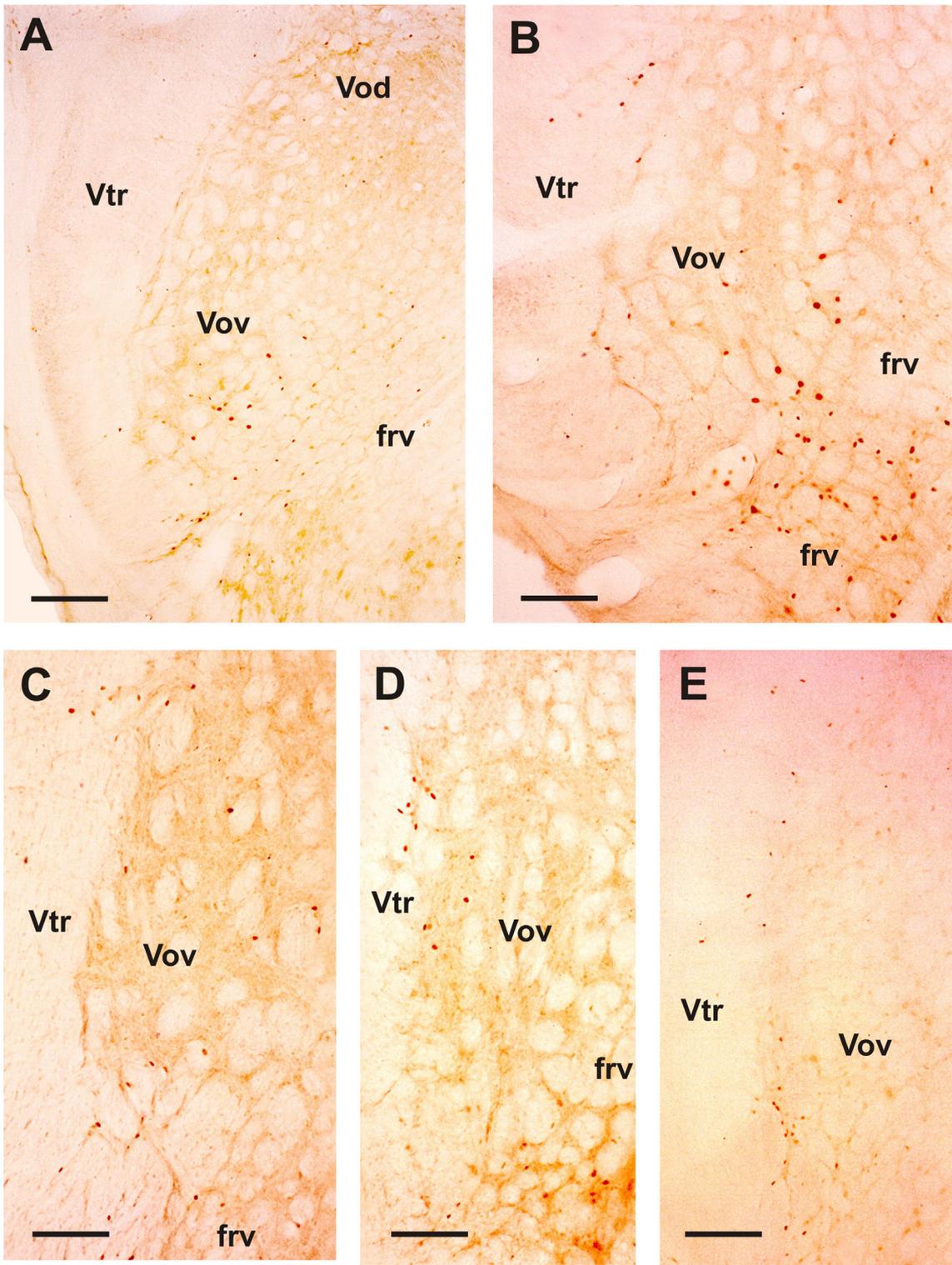


Fig. 9

Fig. 10. Expresión de c-fos a la altura del núcleo interpolar del trigémino ipsilateral inducida por la inyección de aceite de mostaza (A,B,D) y aceite de mostaza previo tratamiento con baclofeno (C). **A:** La inmunorreactividad de c-fos se localiza en la división ventral del núcleo interpolar, fundamentalmente en la región ventromedial, así como en la formación reticular adyacente al mismo. Barra = 100 μm . **B:** El núcleo paratrigeminal dorsal presenta importante inmunorreactividad c-fos. Barra = 100 μm . **C-D:** La expresión de c-fos se halla en el núcleo interpolar ventral, en la formación reticular adyacente al mismo y en el núcleo paratrigeminal ventral. Obsérvese que la inmunorreactividad para c-fos en el núcleo paratrigeminal persiste tras el tratamiento con el fármaco agonista del sistema GABA_B (D). Barra = 200 μm . **E:** Intensa expresión de c-fos en la región ventral del núcleo interpolar y en toda la extensión dorsoventral del núcleo paratrigeminal ventral. Barra = 100 μm .

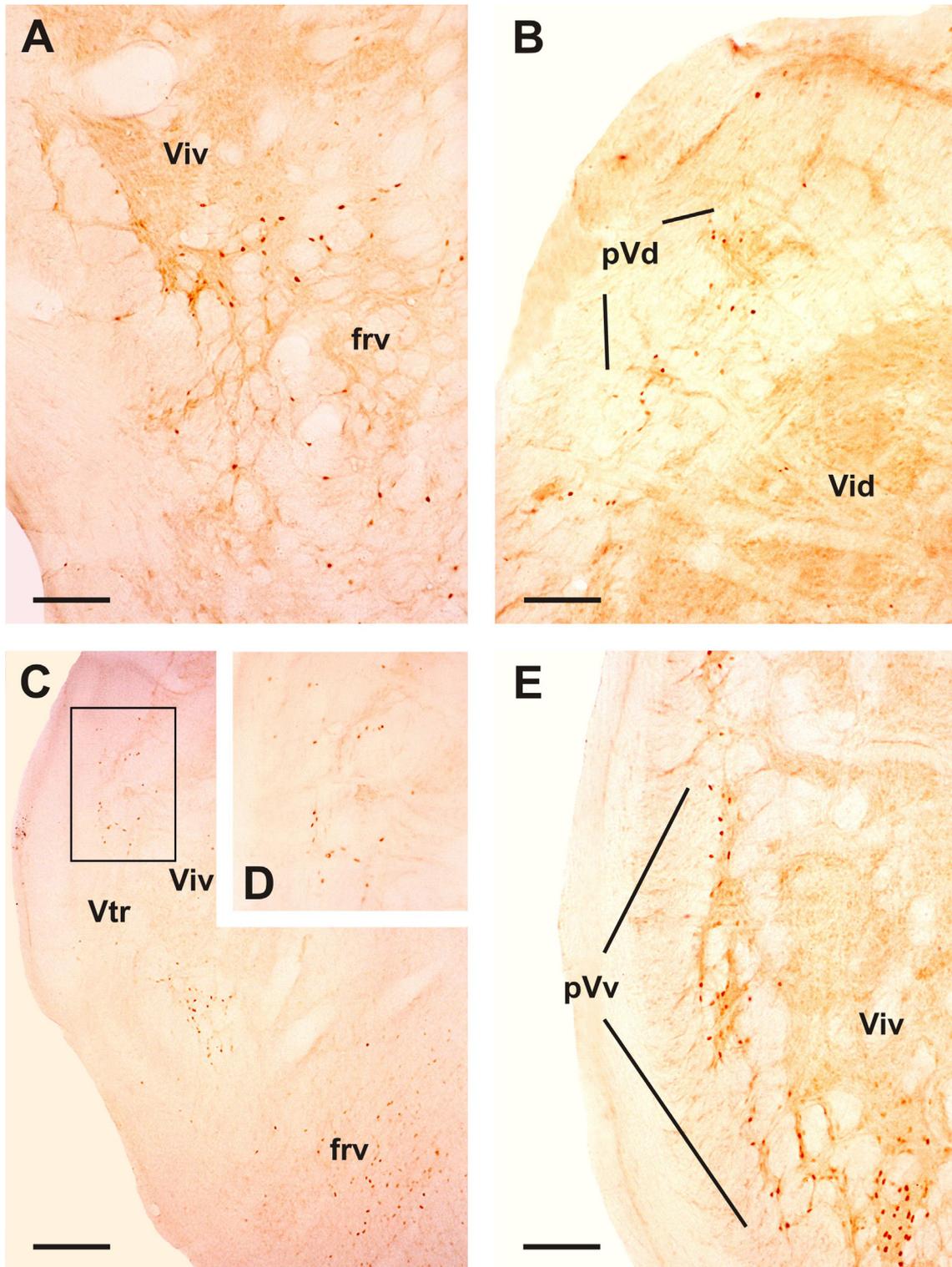


Fig. 10

Fig. 11. Expresión de c-fos en los tercios rostral (A) y final (B-D) del núcleo caudal del trigémino tras la inyección de aceite de mostaza (A,B) o aceite de mostaza tras un tratamiento previo con faclofeno (C) o baclofeno (D). **A-C:** Obsérvese la presencia masiva de expresión de c-fos en los dos tercios ventrales (A,C) y en el tercio medio (B) de las láminas I y IIo, y en menor medida también en las láminas III y V de Rexed. **D:** La expresión de c-fos prácticamente sólo es observada en las láminas más superficiales del núcleo caudal tras la administración de un agonista del sistema GABA_B. Barra = 200 μ m.

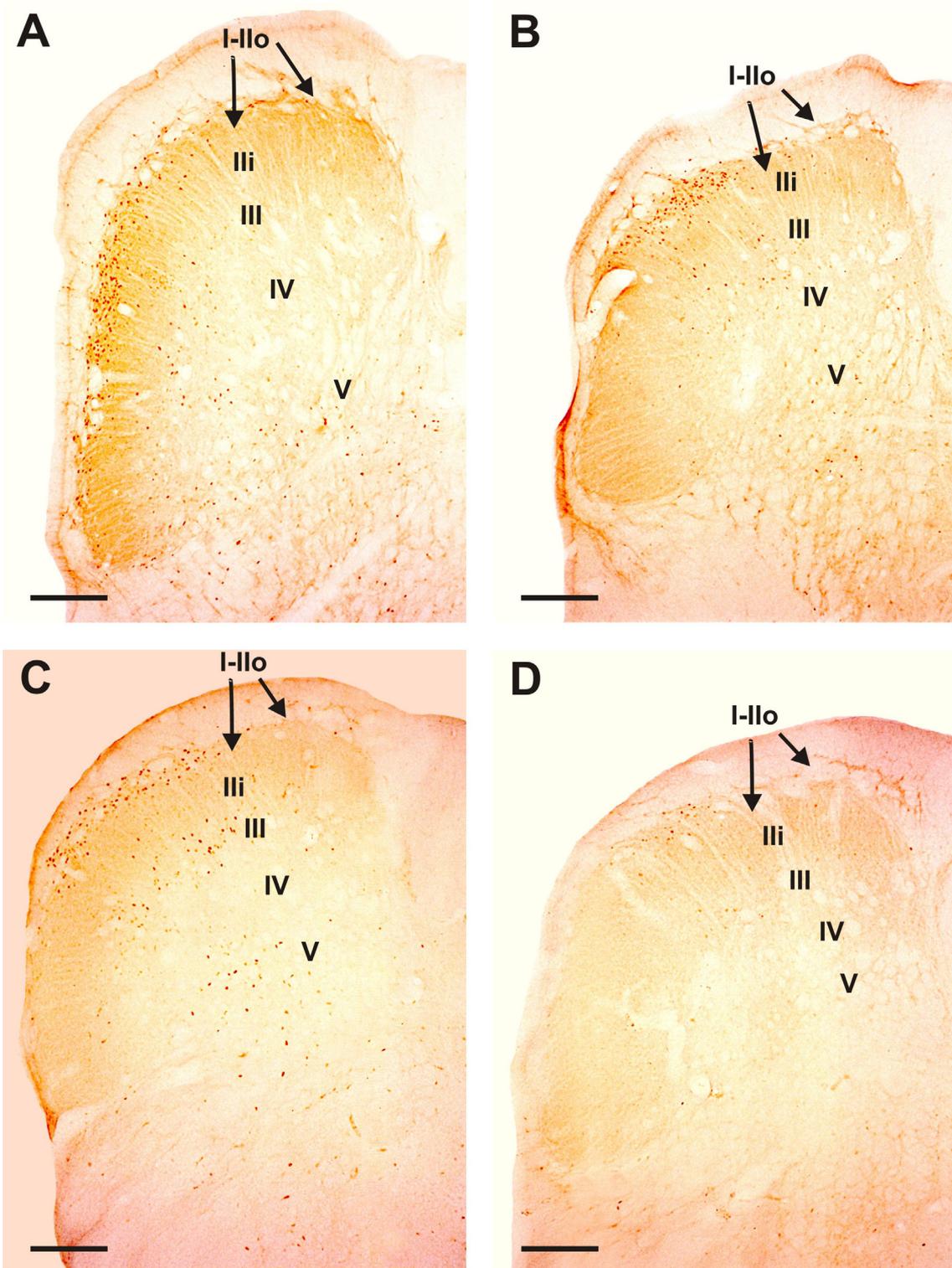


Fig. 11

Fig. 12. Expresión de c-fos en el complejo parabraquial (A-B) y en el complejo nuclear sensitivo del trigémino (C-D) de la rata tras la inyección de aceite de mostaza en la región de las vibrisas. **A:** La inmunorreactividad de c-fos en el complejo parabraquial ipsilateral se localiza fundamentalmente en el núcleo parabraquial lateral, y más concretamente en el subnúcleo parabraquial lateral externo. **B:** La expresión de c-fos en el complejo parabraquial contralateral se halla masivamente en los subnúcleos parabraquial lateral externo y medial externo. **C:** La expresión de c-fos únicamente está presente en la formación reticular adyacente al núcleo sensitivo trigeminal y al núcleo motor del facial (flecha). Nótese la ausencia de neuronas c-fos positivas en el núcleo oral del trigémino. **D:** La expresión de c-fos se localiza de manera manifiesta en las láminas I y II, y en menor medida también en las láminas IV y V de Rexed. Barra = 200 μm .

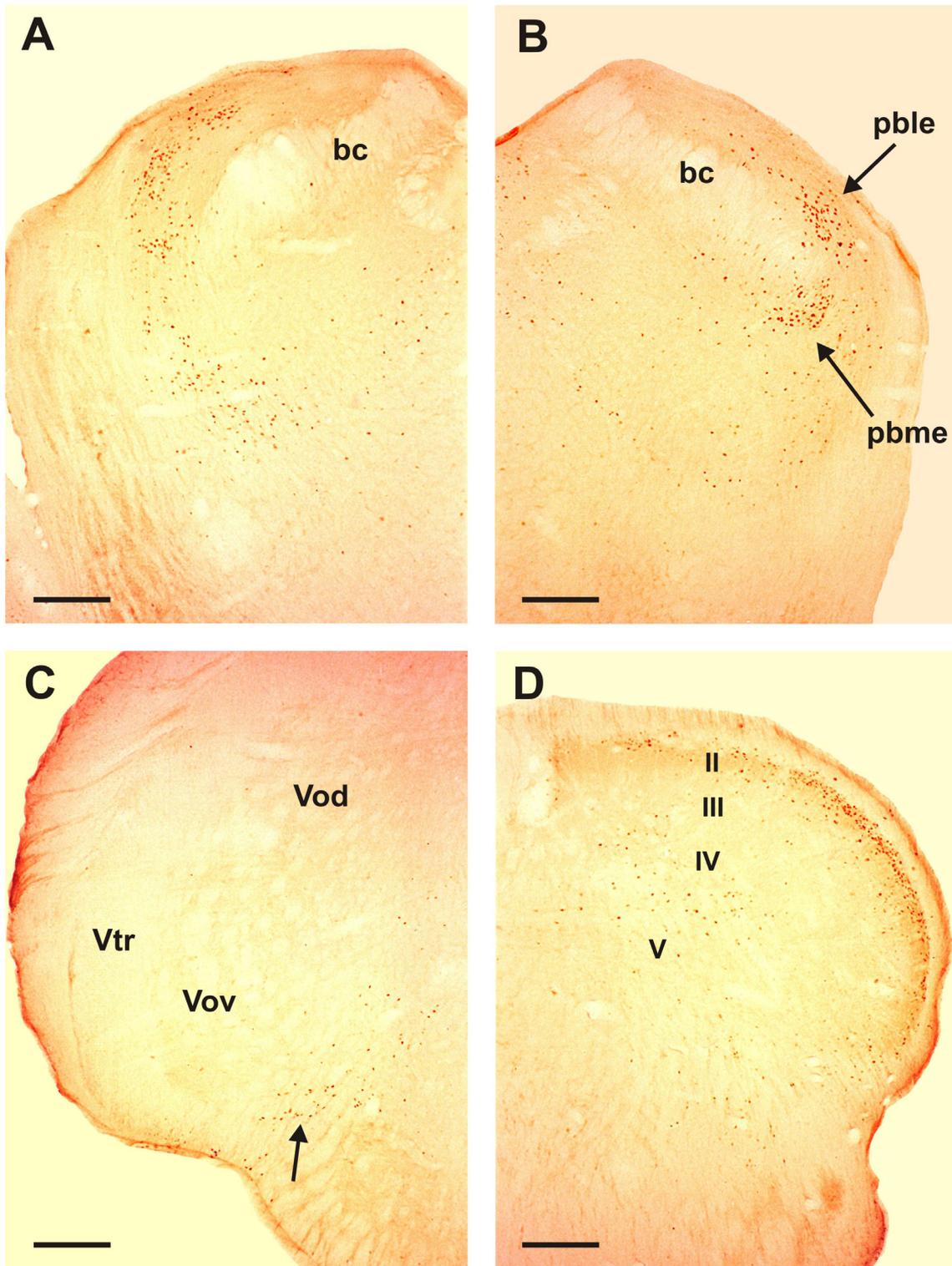


Fig. 12

Fig. 13A-H. Dibujos de cámara clara que muestran la expresión de c-fos inducida por el aceite mineral. Cada punto representa una neurona c-fos positiva. Lado ipsilateral: lado izquierdo de la imagen; lado contralateral: lado derecho de la imagen.

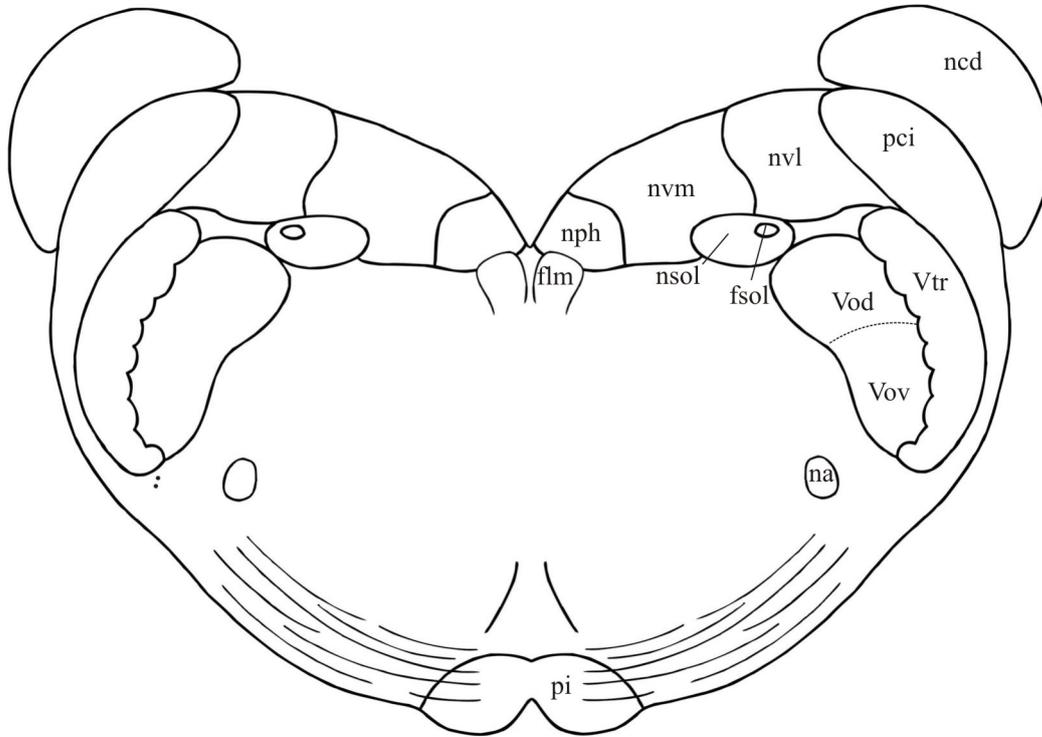


Fig. 13A. Mitad caudal del núcleo oral caudal.

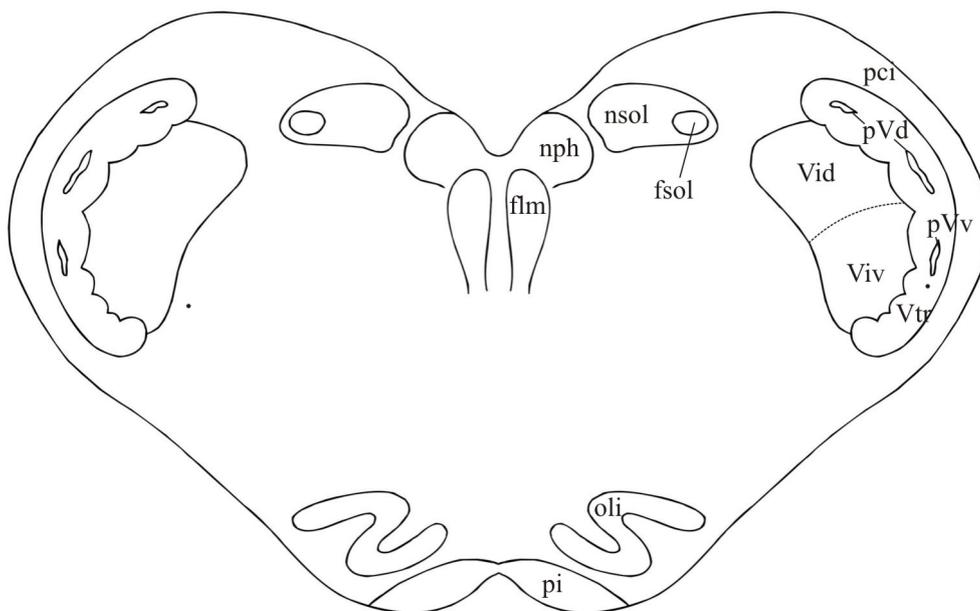


Fig. 13B. Tercio rostral del núcleo intercalar.

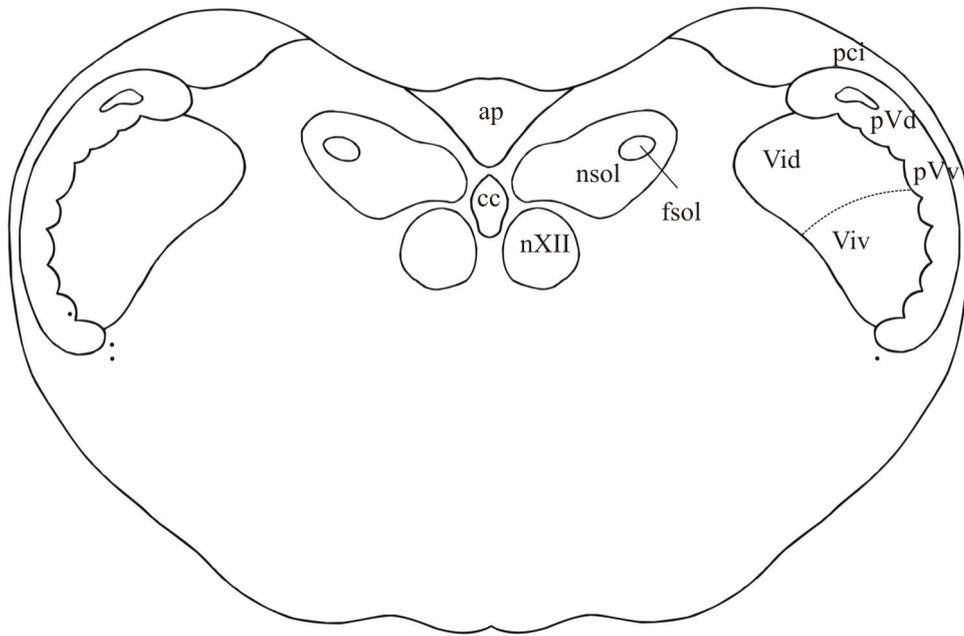


Fig. 13C. Tercio medio del núcleo interpolar.

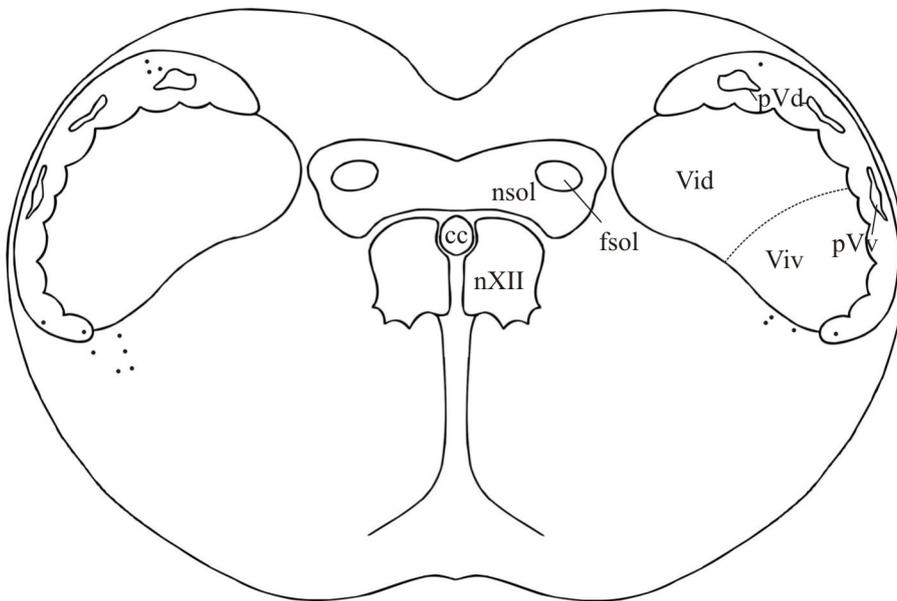


Fig. 13D. Tercio caudal del núcleo interpolar.

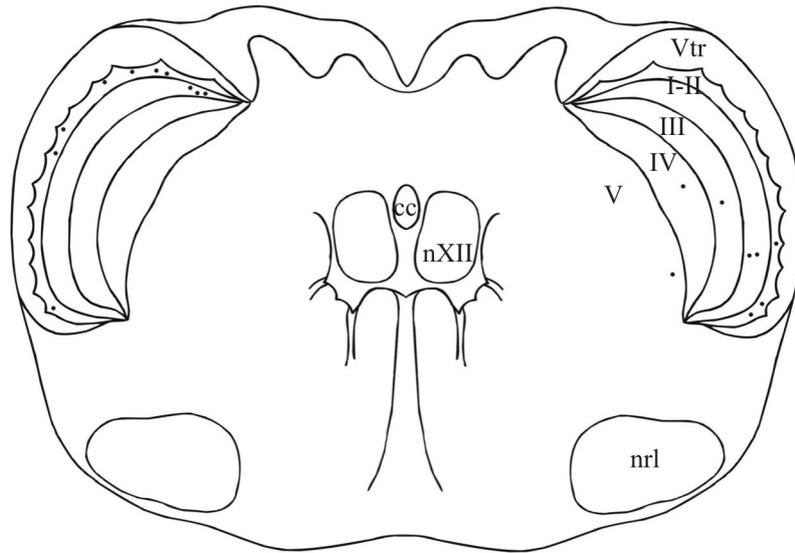


Fig. 13E. Tercio rostral del núcleo caudal.

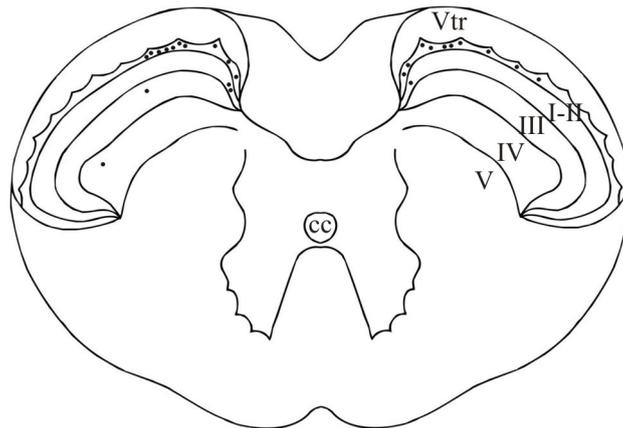


Fig. 13F. Tercio medio del núcleo caudal.

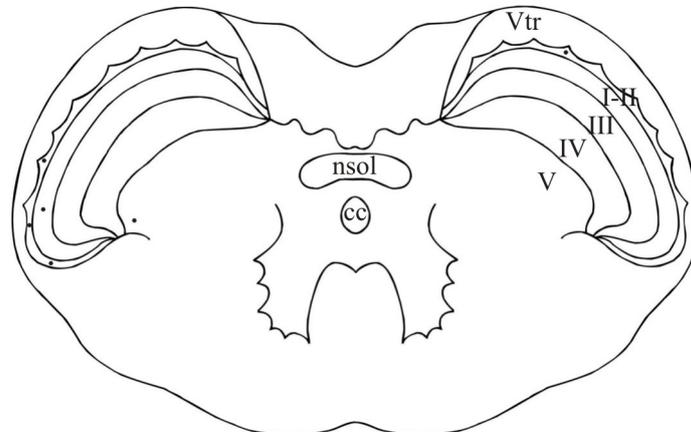


Fig. 13G. Tercio caudal del núcleo caudal.

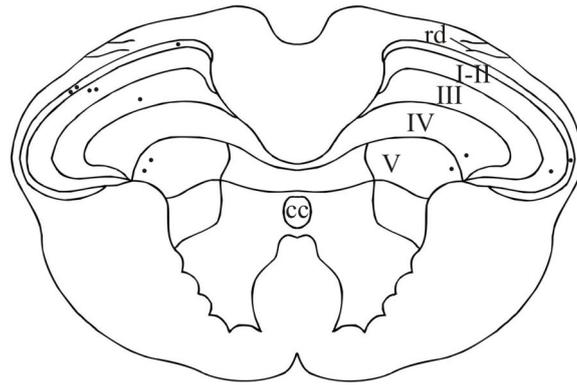


Fig. 13H. Primer segmento cervical.

Fig. 14A-L. Dibujos de cámara clara que muestran la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza. Cada punto representa una neurona c-fos positiva. Lado ipsilateral: lado izquierdo de la imagen; lado contralateral: lado derecho de la imagen.

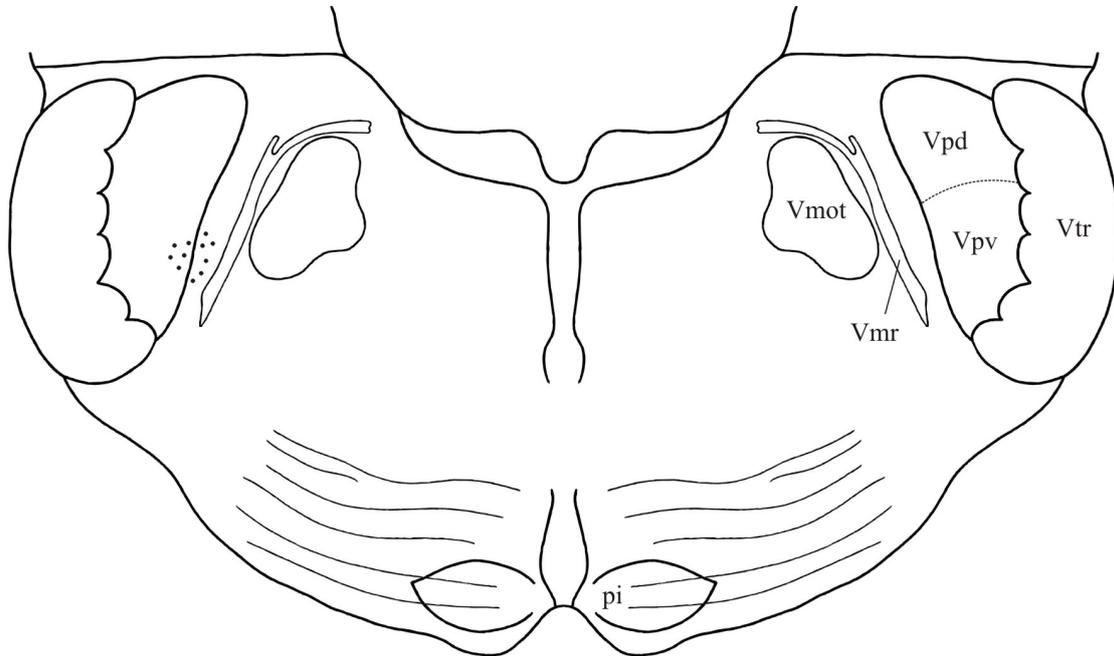


Fig. 14A. Mitad caudal del núcleo principal.

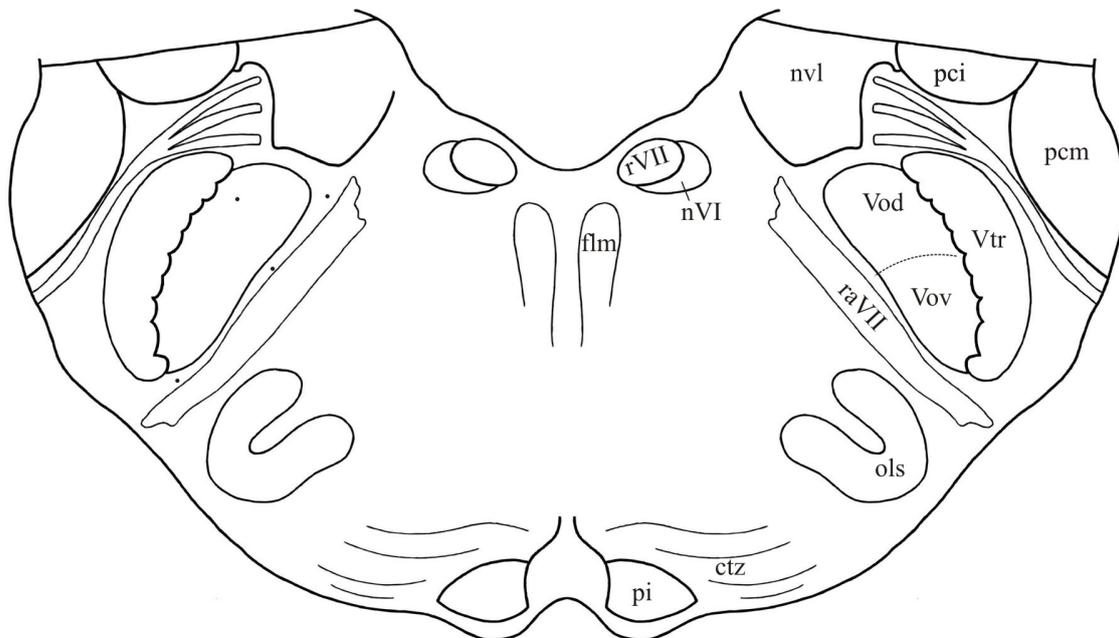


Fig. 14B. Mitad rostral del núcleo oral rostral.

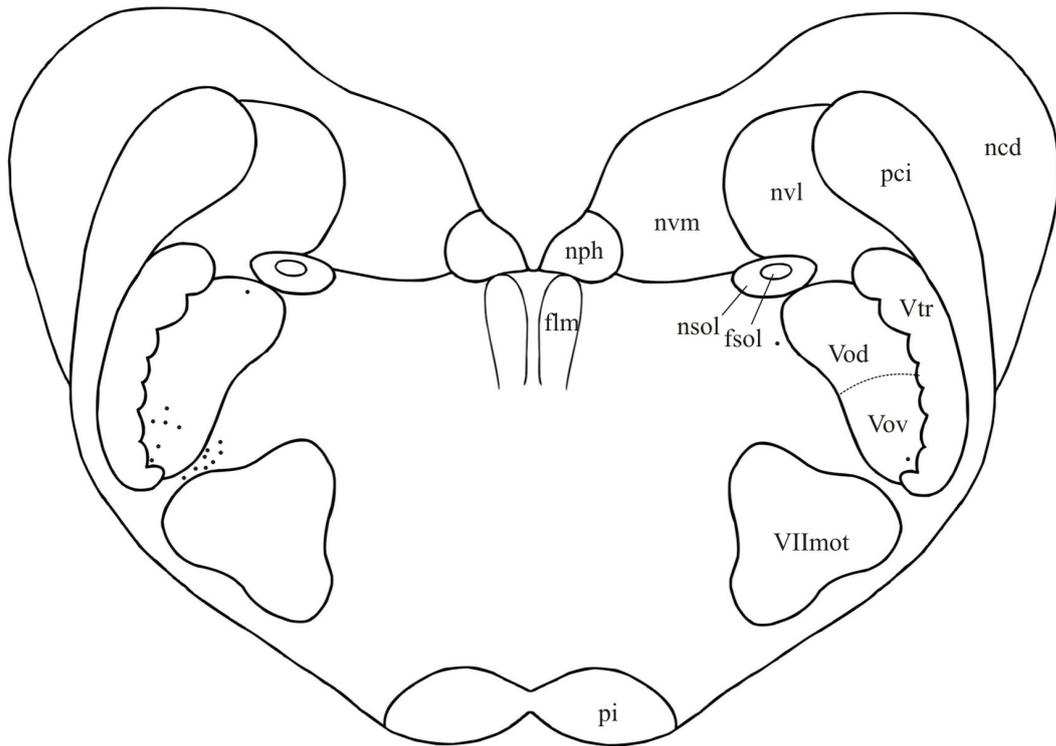


Fig. 14C. Mitad caudal del núcleo oral rostral.

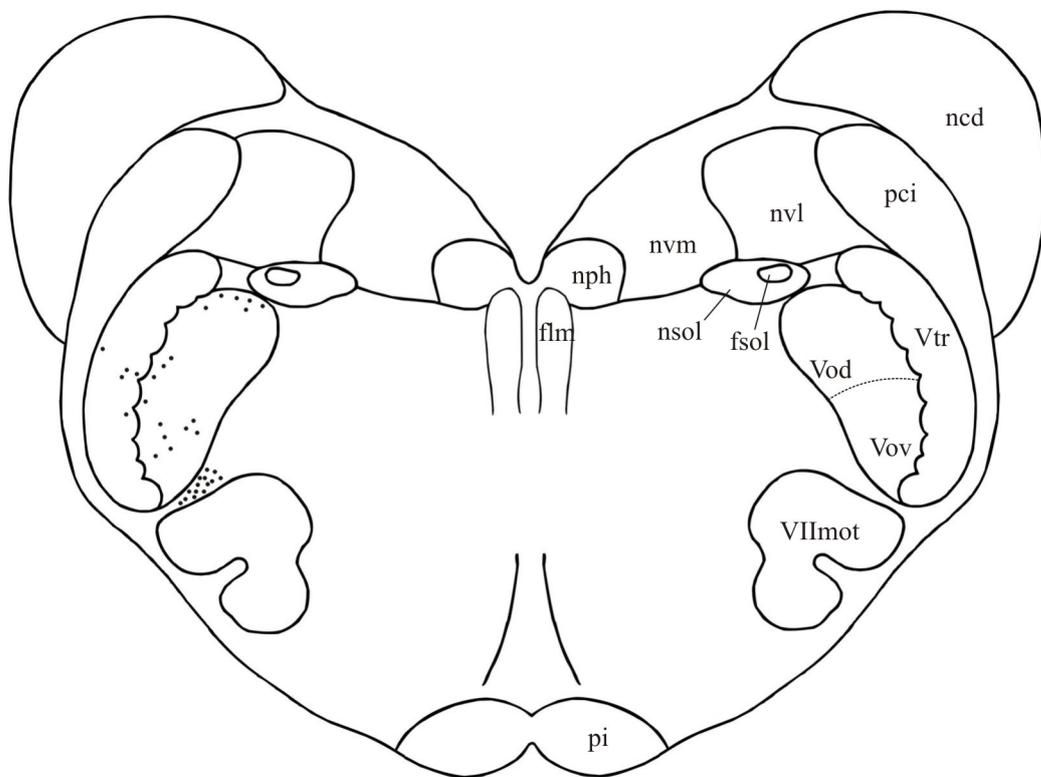


Fig. 14D. Mitad rostral del núcleo oral caudal.

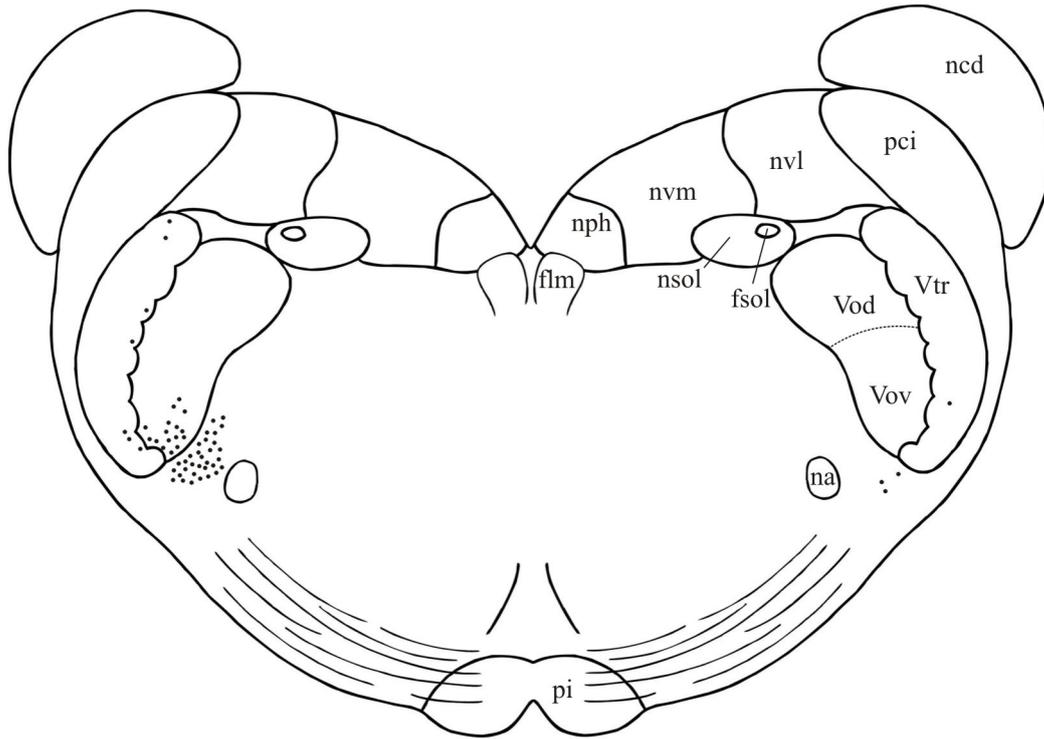


Fig. 14E. Mitad caudal del núcleo oral caudal.

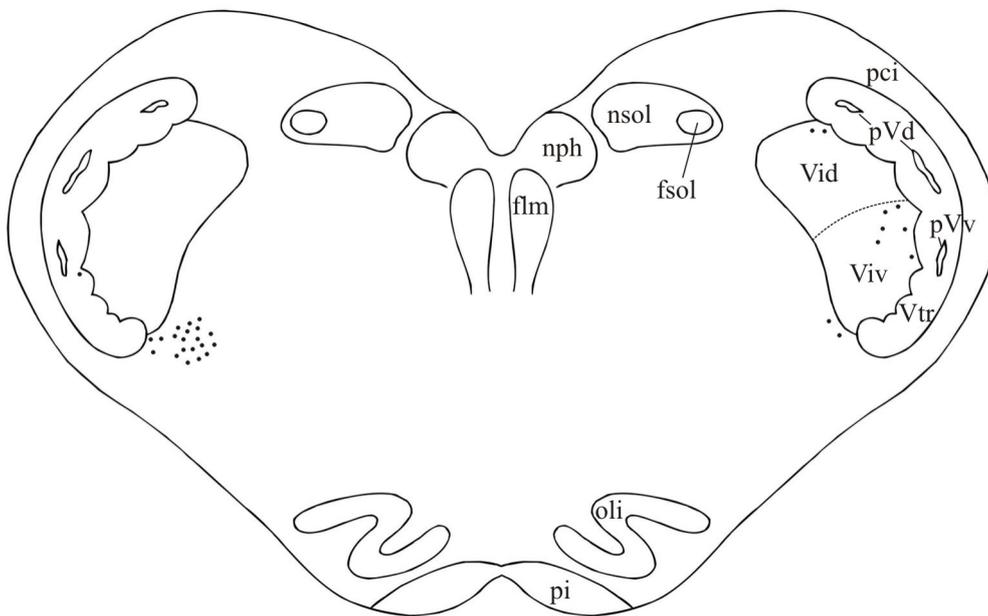


Fig. 14F. Tercio rostral del núcleo inter polar.

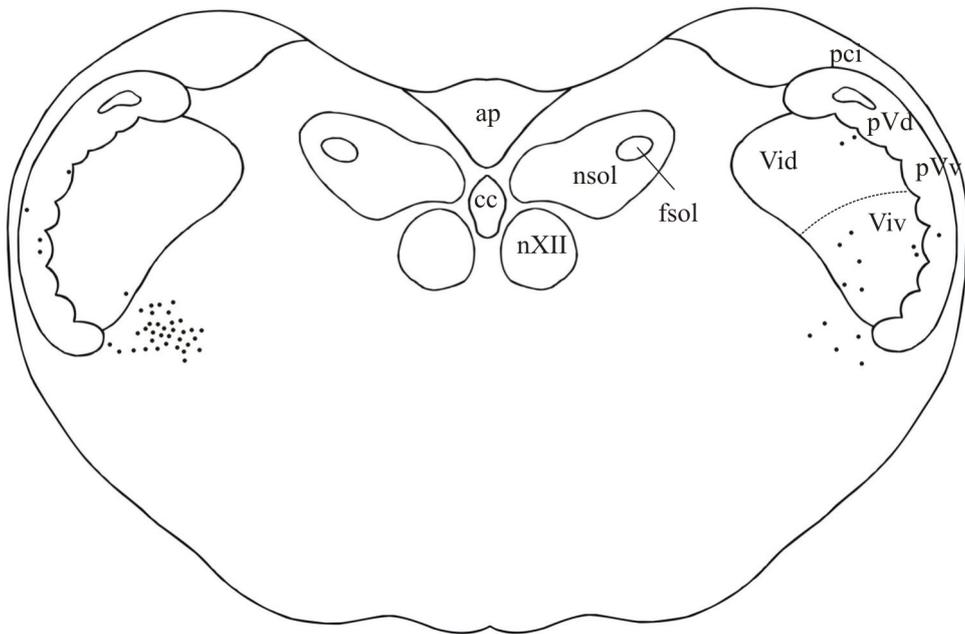


Fig. 14G. Tercio medio del núcleo interpolar.

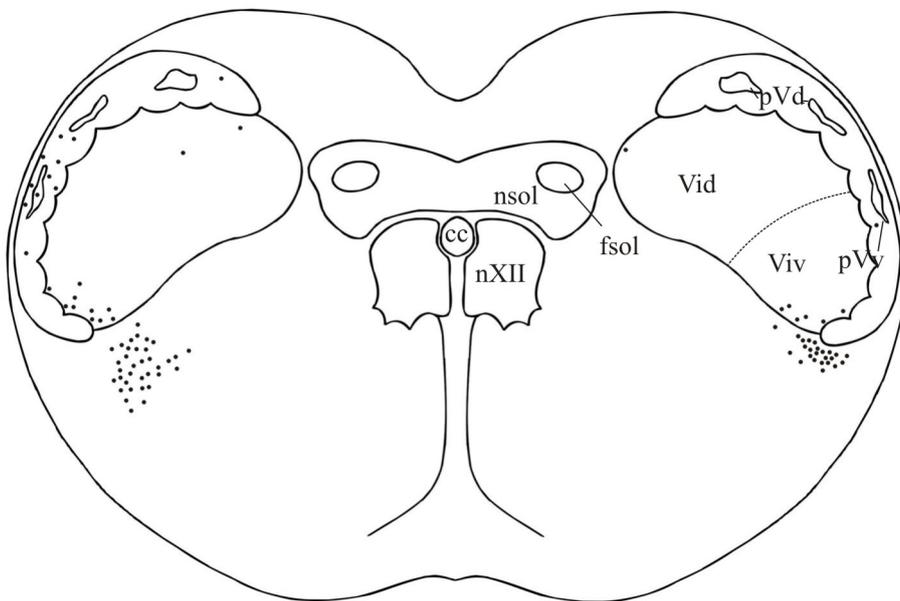


Fig. 14H. Tercio caudal del núcleo interpolar.

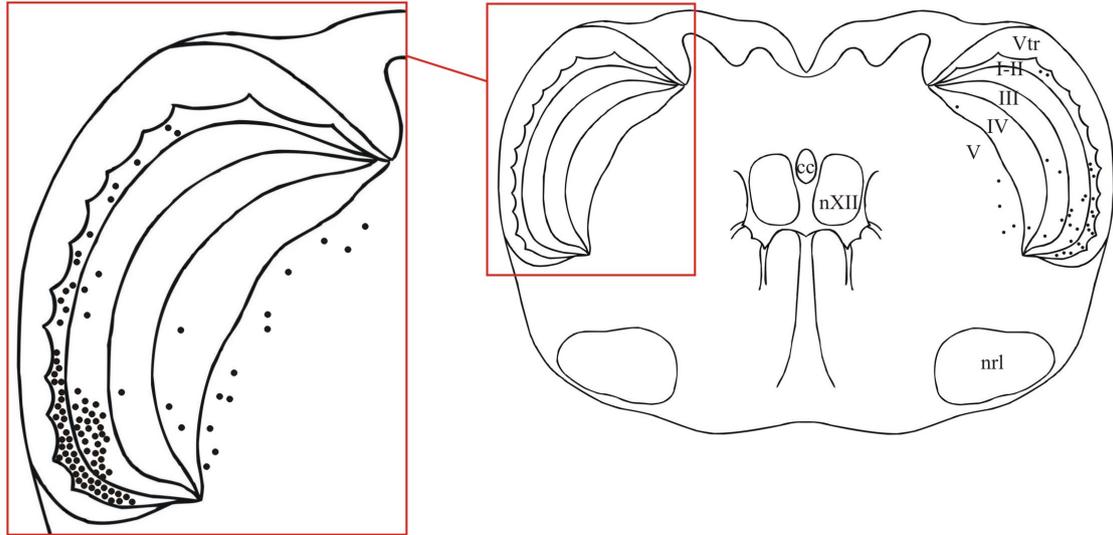


Fig. 14I. Tercio rostral del núcleo caudal.

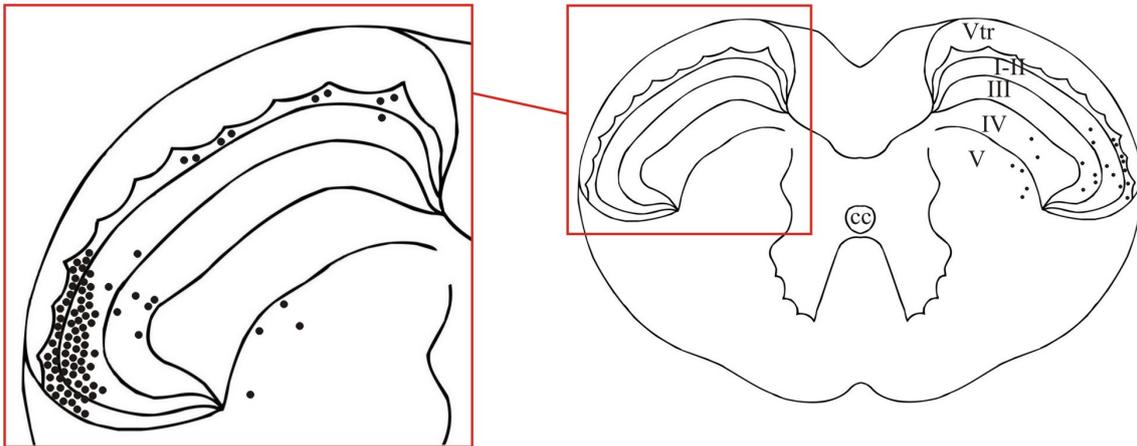


Fig. 14J. Tercio medio el núcleo caudal.

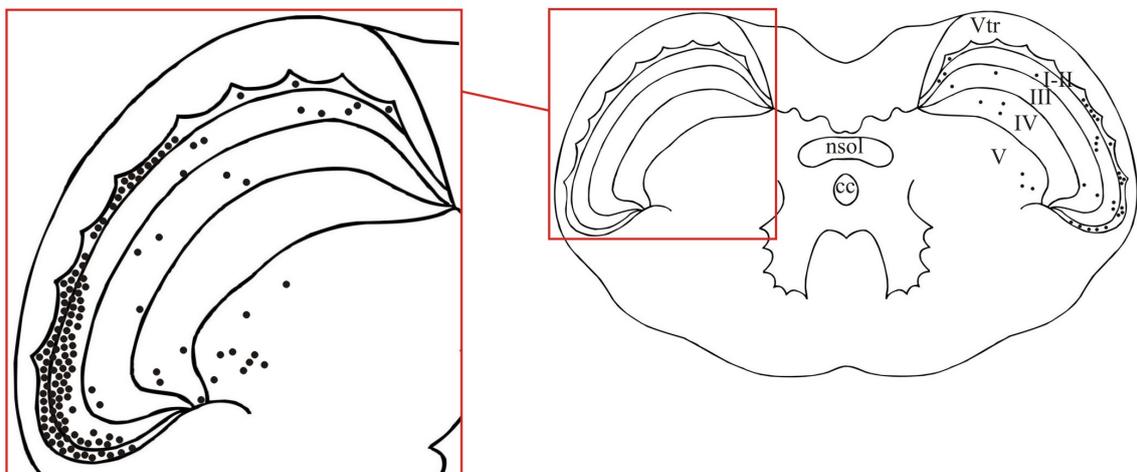


Fig. 14K. Tercio caudal del núcleo caudal.

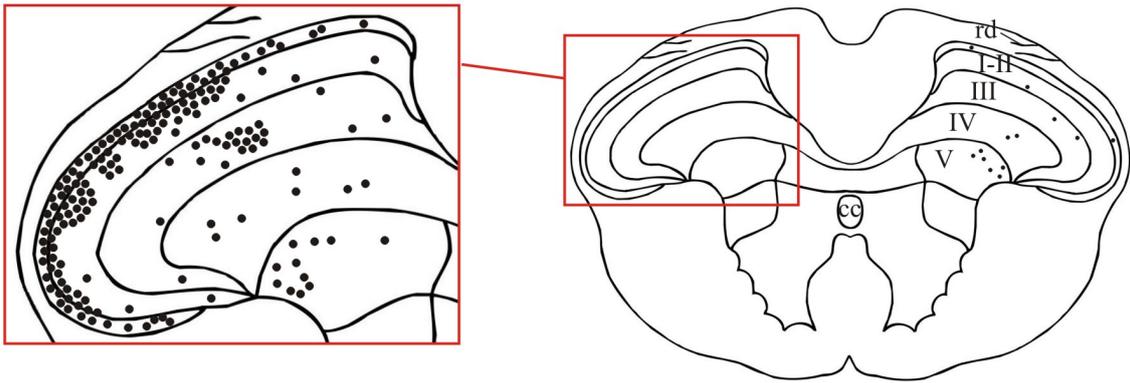


Fig. 14L. Primer segmento cervical.

Fig. 15A-L. Dibujos de cámara clara que muestran la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza tras el pretratamiento con faclofeno. Cada punto representa una neurona c-fos positiva. Lado ipsilateral: lado izquierdo de la imagen; lado contralateral: lado derecho de la imagen.

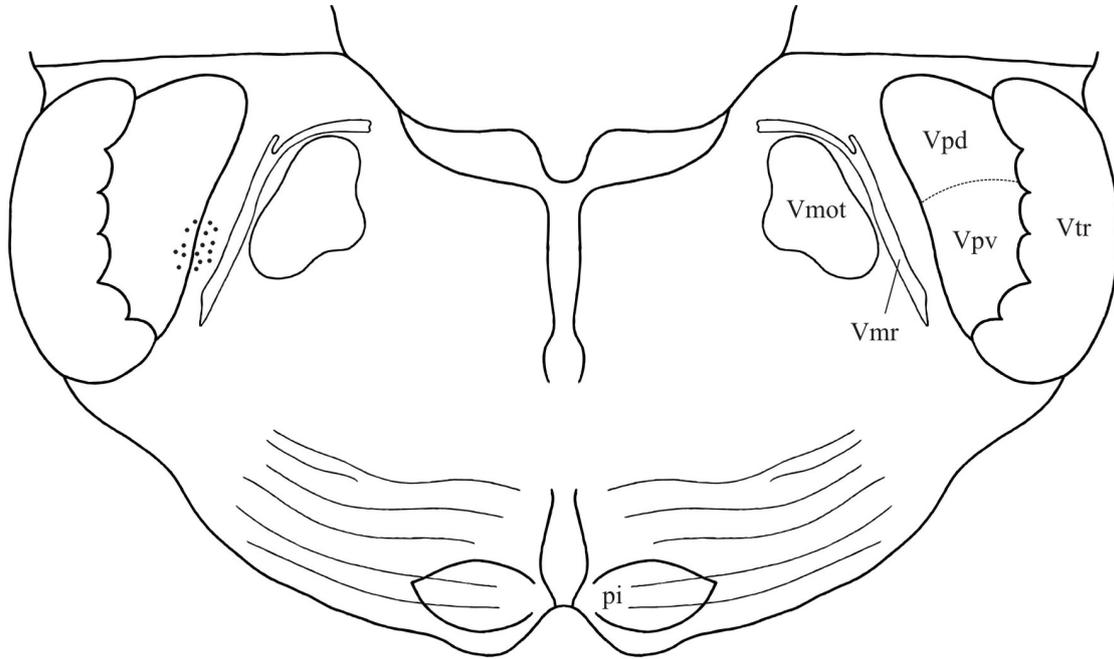


Fig. 15A. Mitad caudal del núcleo principal.

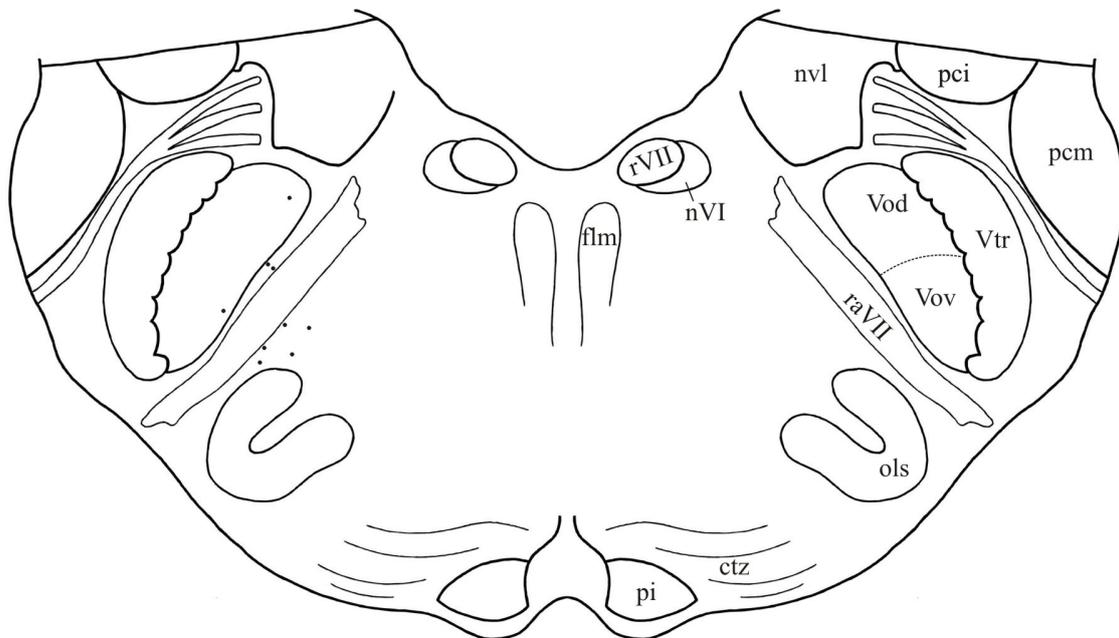


Fig. 15B. Mitad rostral del núcleo oral rostral.

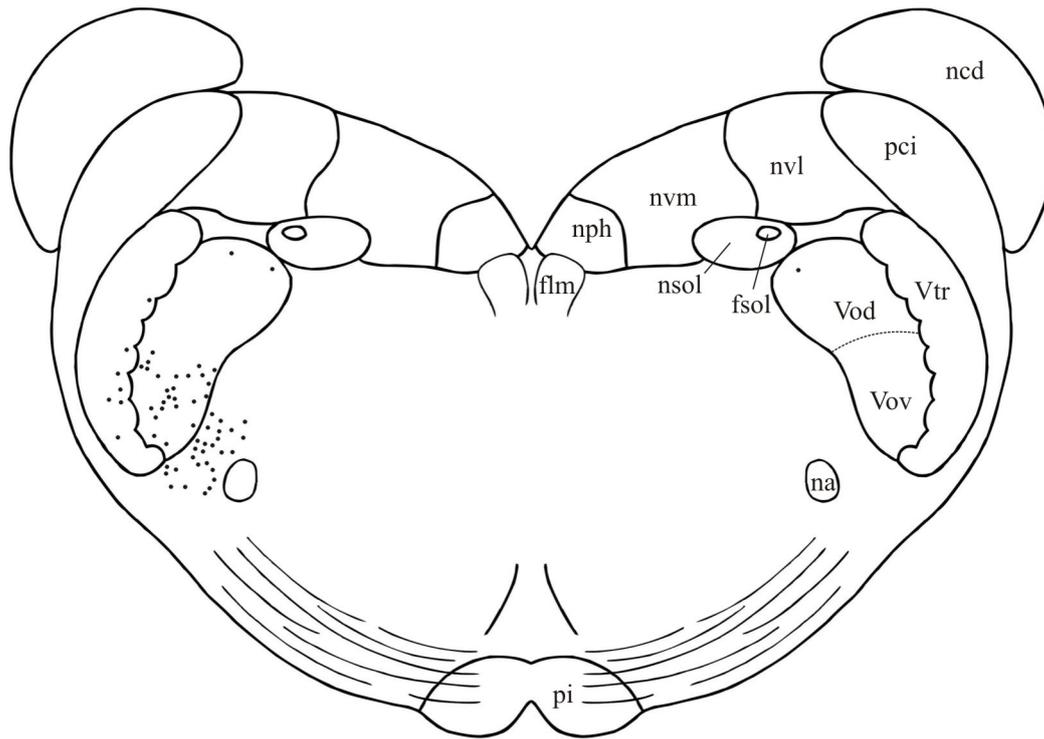


Fig. 15E. Mitad caudal del núcleo oral caudal.

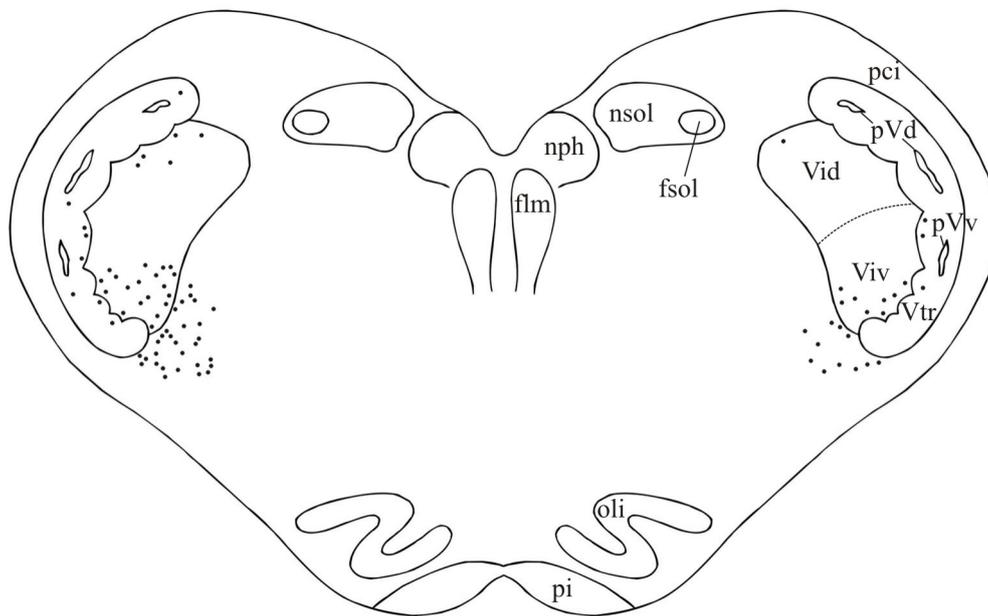


Fig. 15F. Tercio rostral del núcleo interpolar.

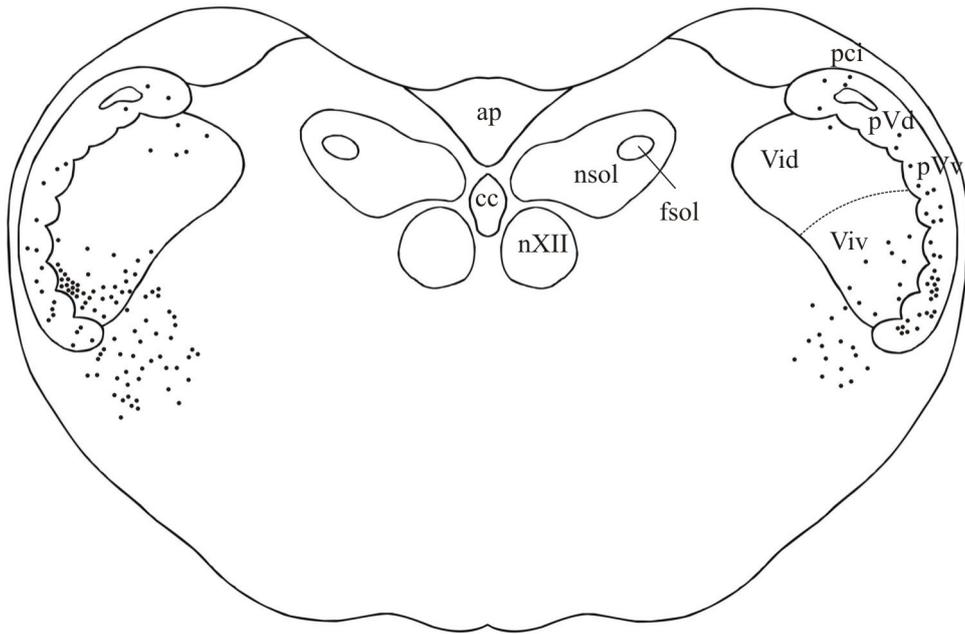


Fig. 15G. Tercio medio del núcleo interpolar.

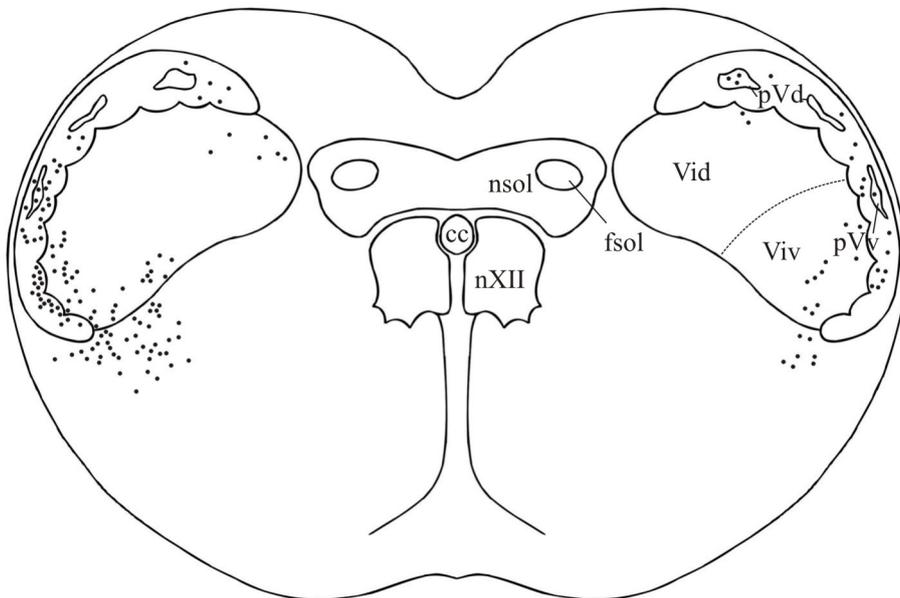


Fig. 15H. Tercio caudal del núcleo interpolar.

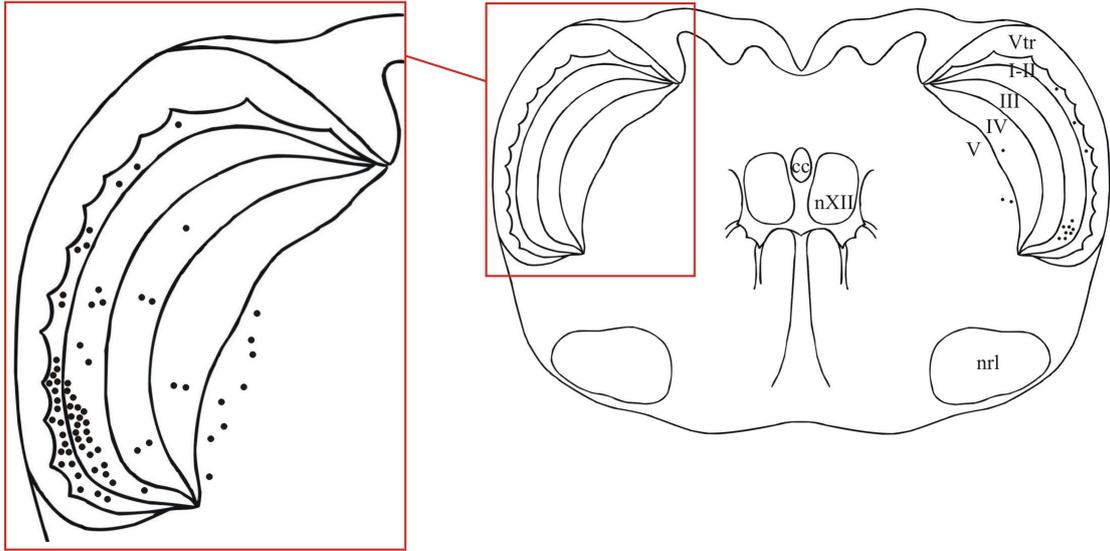


Fig. 15I. Tercio rostral del núcleo caudal.

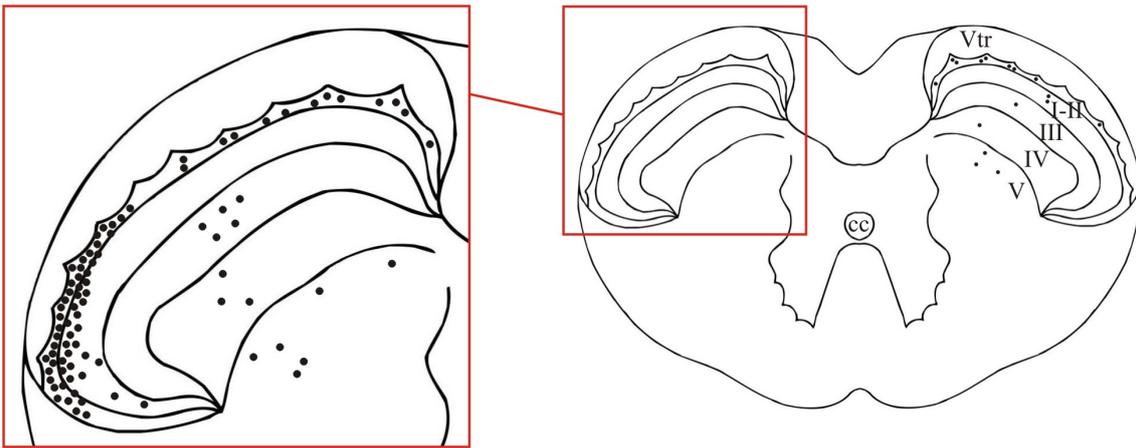


Fig. 15J. Tercio medio el núcleo caudal.

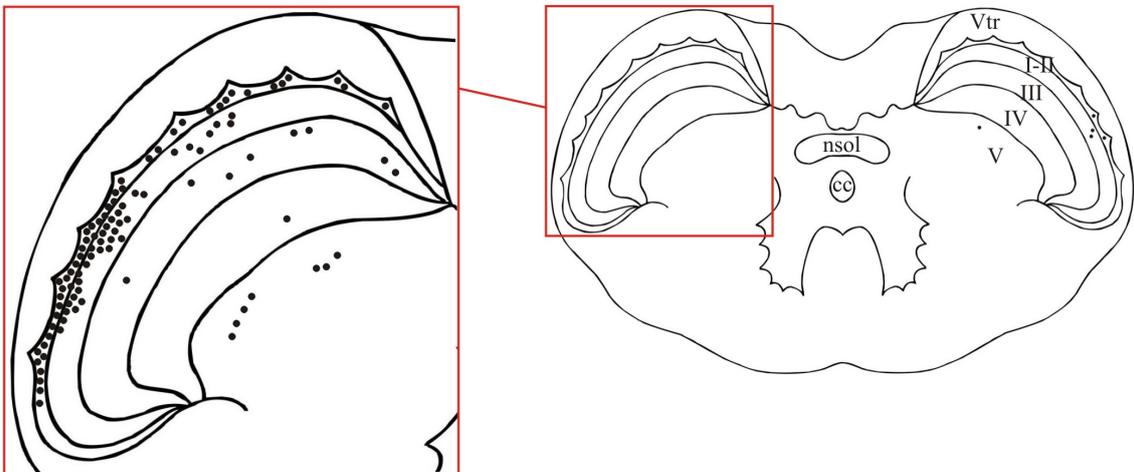


Fig. 15K. Tercio caudal del núcleo caudal.

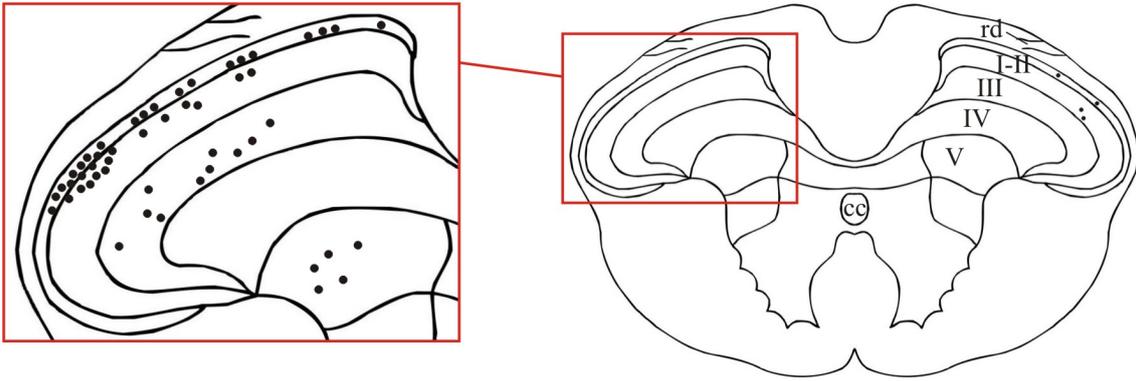


Fig. 15L. Primer segmento cervical.

Fig. 16A-I. Dibujos de cámara clara que muestran la expresión de c-fos inducida por el aceite de mostaza tras el pretratamiento con baclofeno. Cada punto representa una neurona c-fos positiva. Lado ipsilateral: lado izquierdo de la imagen; lado contralateral: lado derecho de la imagen.

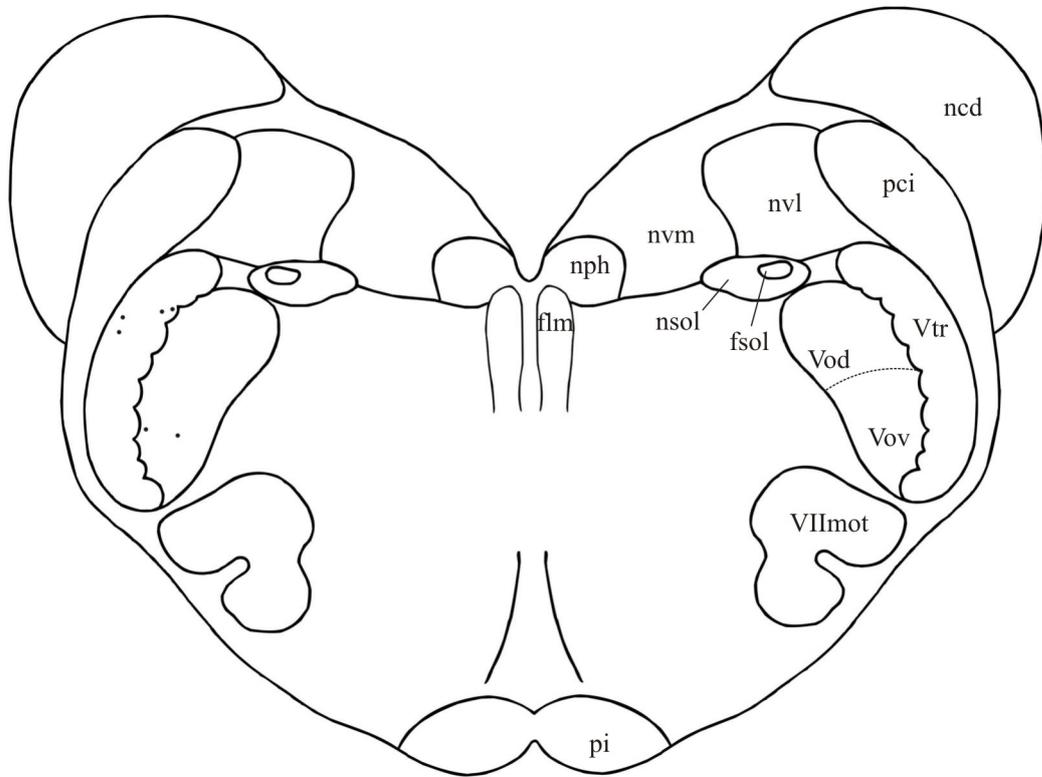


Fig. 16A. Mitad rostral del núcleo oral caudal.

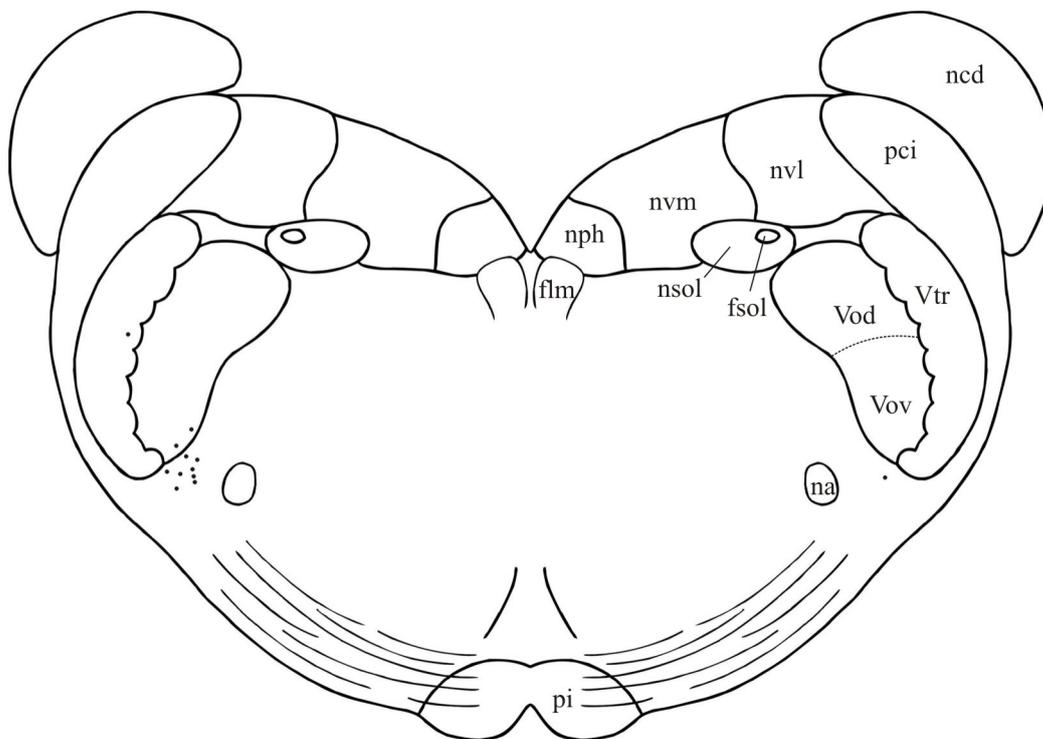


Fig. 16B. Mitad caudal del núcleo oral caudal.

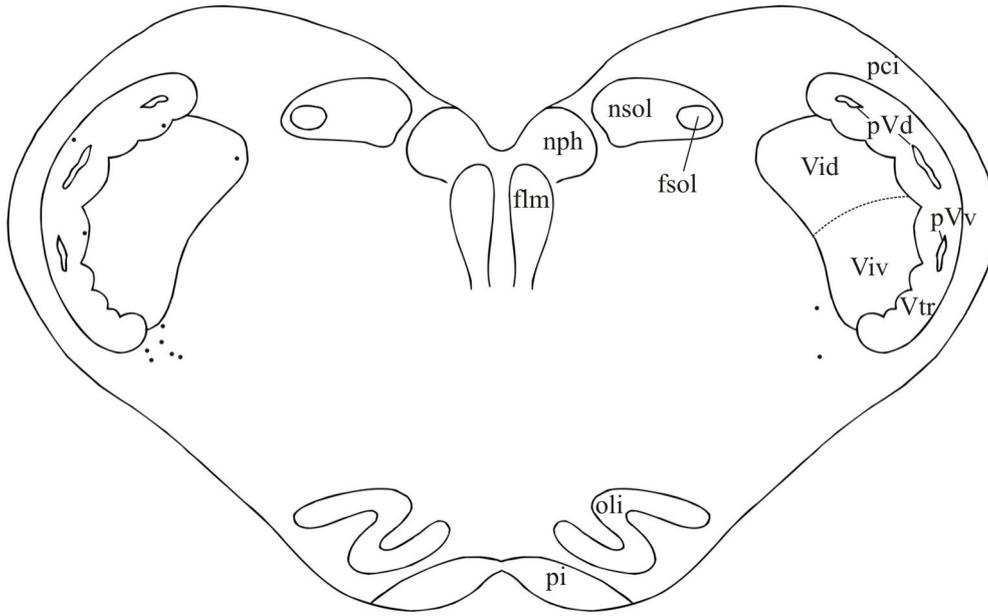


Fig. 16C. Tercio rostral del núcleo intercalar.

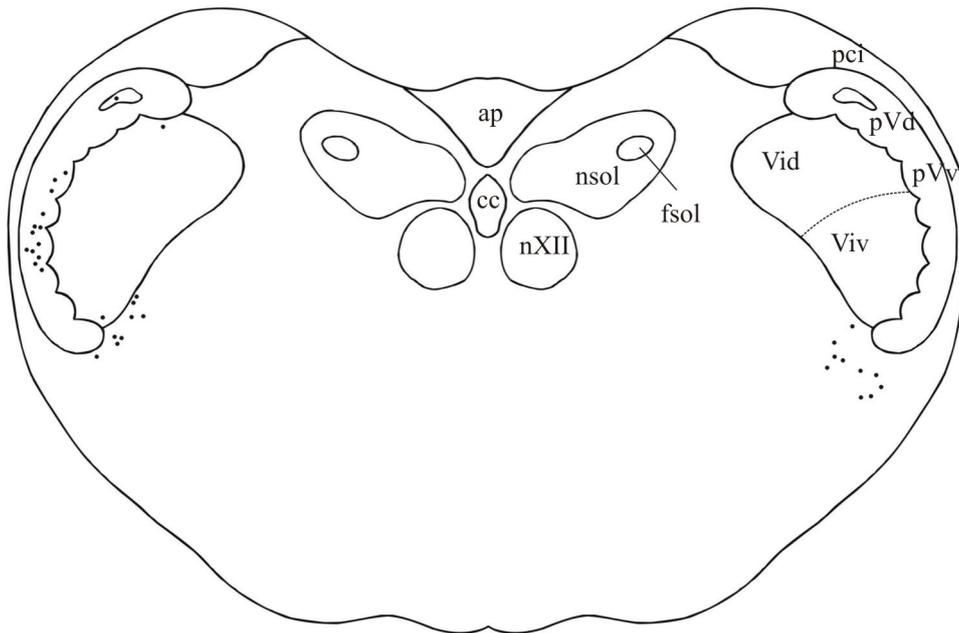


Fig. 16D. Tercio medio del núcleo intercalar.

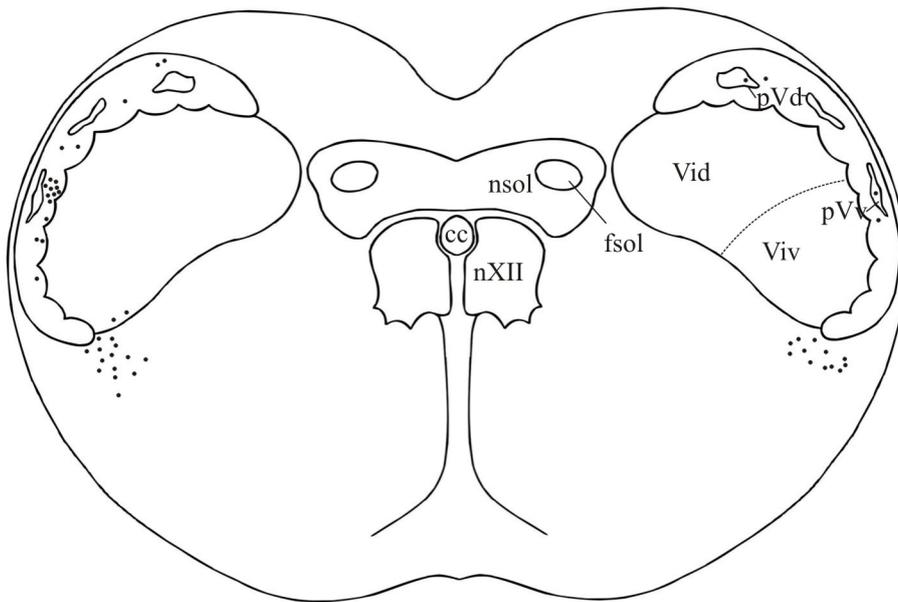


Fig. 16E. Tercio caudal del núcleo interpolares.

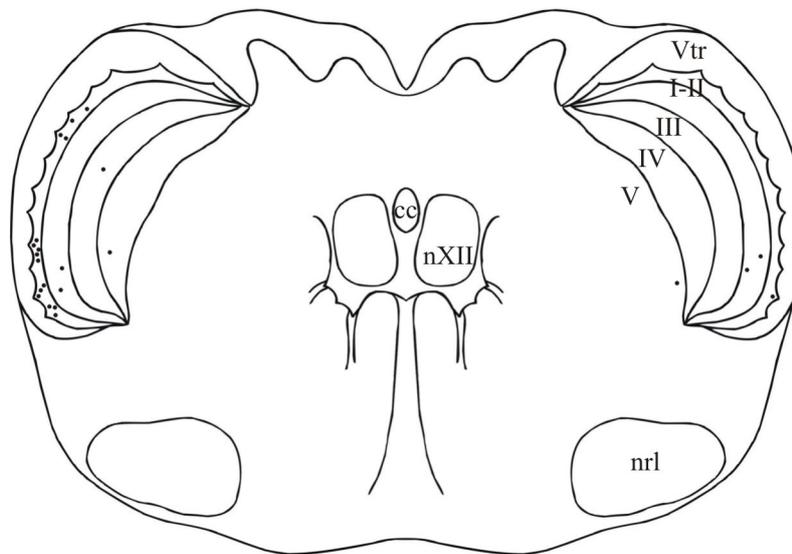


Fig. 16F. Tercio rostral del núcleo caudal.

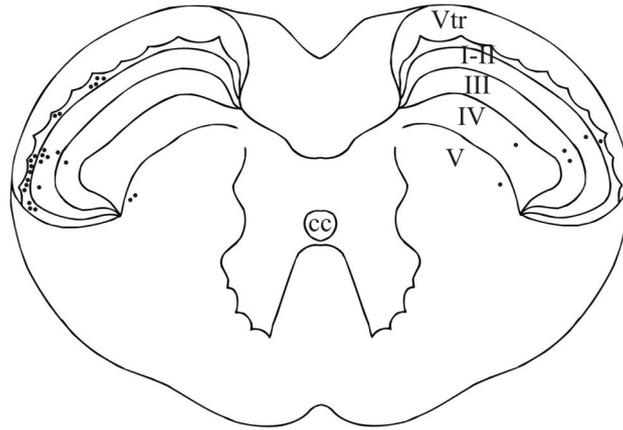


Fig. 16G. Tercio medio del núcleo caudal.

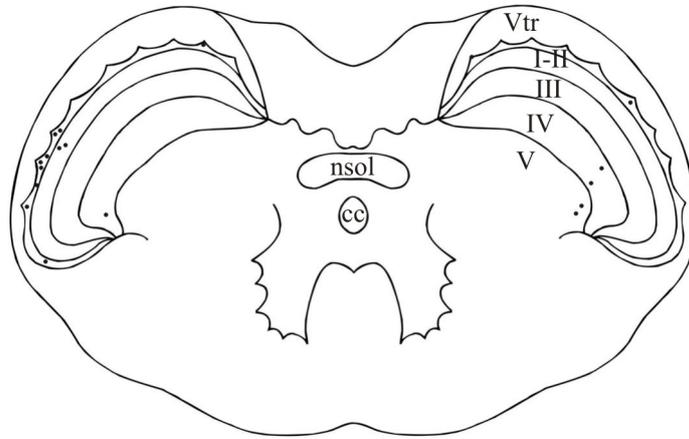


Fig. 16H. Tercio caudal del núcleo caudal.

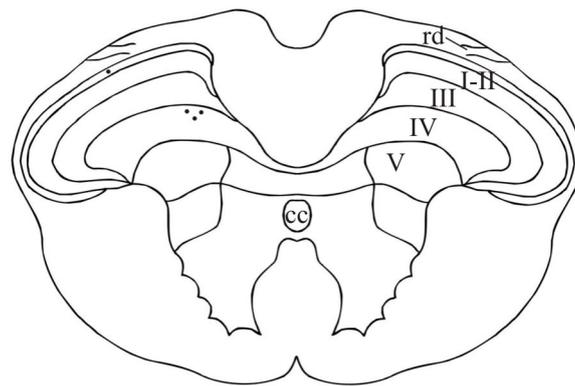


Fig. 16I. Primer segmento cervical.

9. Bibliografía



- Abbott, F.V., Franklin, K.B.J. and Connell, B. (1986), The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin, *Eur. J. Pharmacol.*, **126**, 141-144.
- Abbott, F.V., Franklin, K.B.J. and Westbrook, R.F. (1995), The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats, *Pain*, **60**, 91-102.
- Abrahams, V.C. and Richmond, F.J.R., Motor role of the spinal projections of the trigeminal system. In: Anderson, D.J. and Matthews, B. (eds): Pain in the trigeminal region. Amsterdam, Elsevier/North Holland, 1977, pp. 405-411.
- Ács, G., Palkovits, M. and Blumberg, P.M. (1996), Specific binding of [³H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations, *Life Sci.*, **59**, 1899-1908.
- Adams, J.C. (1977), Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker, *Neuroscience*, **2**, 141-145.
- Adams, J.C. (1980), Stabilizing and rapid thionin staining of TMB-based HRP reaction product, *Neurosci. Lett.*, **17**, 7-9.
- Adamson, E.D., Meek, J. and Edwards, S.A. (1985), Product of the cellular oncogene, c-fos, observed in mouse and human tissues using an antibody to a synthetic peptide, *EMBO J.*, **4**, 941-947.
- Adriaensen, H., Gybels, J., Handwerker, H.O. and Van Hees, J. (1981), Response properties of thin myelinated (A-delta) fibres in human skin nerves, *Pain*, **Suppl. 1**: S89.
- Aihara, Y., Maeda, T., Hanada, K. and Wakisaka, S. (1999), Effects of morphine on the distribution of Fos protein in the trigeminal subnucleus caudalis neurons during experimental tooth movement of the rat molar., *Brain Res.*, **819**, 48-57.
- Albe-Fessard, D., Boivie, J., Grant, G. and Levante, A. (1975), Labelling of cells in the medulla oblongata and the spinal cord of the monkey after injections of horseradish peroxidase in the thalamus, *Neurosci. Lett.*, **1**, 75-80.
- Aldskogius, H., Arvidsson, J. and Hansson, P. (1988), Carbonic anhydrase enzyme histochemistry of cranial nerve primary sensory afferent neurons in the rat, *Histochemistry*, **88**, 151-154.
- Allan, A.M. and Harris, R.A. (1989), A new alcohol antagonist: phaclofen, *Life Sci.*, **45**, 1771-1779.
- Allen, G.V., Barbrick, B. and Esser, M.J. (1996), Trigeminal-parabrachial connections: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses, *Brain Res.*, **715**, 125-135.
- Alreja, M., Mutalik, P.G., Nayar, U. and Manchanda, S.K. (1984), The formalin test: a tonic pain model in the primate, *Pain*, **20**, 97-105.
- Altschuler, S.M., Bao, X., Bieger, D., Hopkins, D.A. and Miselis, R.R. (1989), Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts, *J. Comp. Neurol.*, **283**, 248-268.
- Alving, K., Matran, R. and Lundberg, J.M. (1991), Capsaicin-induced local effector responses, autonomic reflexes and sensory neuropeptide depletion in the pig, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **343**, 37-45.
- Amann, R., Egger, T. and Schuligoi, R. (2000), The tachykinin NK₁ receptor antagonist SR140333 prevents the increase of nerve growth factor in rat paw skin induced by substance P or neurogenic inflammation, *Neuroscience*, **100**, 611-615.
- Amann, R., Schuligoi, R., Holzer, P. and Donnerer, J. (1995), The non-peptide NK1 receptor antagonist SR140333 produces long-lasting inhibition of neurogenic inflammation, but does not influence acute chemo- or thermonociception in rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **352**, 201-205.
- Amano, N., Hu, J.W. and Sessle, B.J. (1986), Responses of neurons in feline trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) to cutaneous, intraoral, and muscle afferent stimuli, *J. Neurophysiol.*, **55**, 227-243.
- Amano, N., Hu, J.W., Zhong, G. and Sessle, B.J. (1982), Muscle afferent inputs to functionally identified neurones in medullary dorsal horn (trigeminal subnucleus caudalis), *Soc. Neurosci. Abstr.*, **8**, 1023.
- Amara, S.G., Arriza, J.L., Leff, S.E., Swanson, L.W., Evans, R.M. and Rosenfeld, M.G. (1985), Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide, *Science*, **229**, 1094-1097.
- Amara, S.G., Jones, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1982), Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different peptide products, *Nature*, **298**, 240-244.
- Ambalavanar, R. and Morris, R. (1993), An ultrastructural study of the binding of an

- alpha-D-galactose specific lectin from *Griffonia simplicifolia* to trigeminal ganglion neurons and the trigeminal nucleus caudalis in the rat, *Neuroscience*, **52**, 699-709.
- Anderson, D.J., Hannam, A.G. and Matthews, B. (1970), Sensory mechanisms in mammalian teeth and their supporting structures, *Physiol. Rev.*, **50**, 171-195.
- Andres, K.H. (1961), Untersuchungen über den feinaufbau von spinal ganglion, *Z. Zellforsch.*, **55**, 1-48.
- Anthony, J. Le névrage des mammifères. In: Grassé, P.P. (ed.): *Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie*, Tome XVI, Fascicule IV, Paris, Masson, 1972, pp. 1-275.
- Anton, F., Herdegen, T., Peppel, P. and Leah, J.D. (1991), c-FOS-like immunoreactivity in rat brainstem neurons following noxious chemical stimulation of the nasal mucosa, *Neuroscience*, **41**, 629-641.
- Apkarian, A.V. and Hodge, C.J. (1989a), Primate spinothalamic pathways. I. A quantitative study of the cells of origin of the spinothalamic pathway, *J. Comp. Neurol.*, **288**, 447-473.
- Apkarian, A.V. and Hodge, C.J. (1989b), Primate spinothalamic pathways. II. Cell of origin of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways, *J. Comp. Neurol.*, **288**, 474-492.
- Apkarian, A.V. and Hodge, C.J. (1989c), Primate spinothalamic pathways. III. Thalamic terminations of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways, *J. Comp. Neurol.*, **288**, 493-511.
- Aranda, F., Villalain, J. and Gómez-Fernández, J.C. (1995), Capsaicin affects the structure and phase organization of phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 225-234.
- Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M.C., De Biasi, S. and Spreafico, R. (1997), GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity?, *Brain Res. Bull.*, **42**, 27-37.
- Aronin, N., Sagar, S.M., Sharp, F.R. and Schwartz, W.J. (1990), Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5959-5962.
- Arvidsson, J. (1986), Transganglionic degeneration in vibrissae innervating primary sensory neurons of the rat: a light and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, **249**, 392-403.
- Arvidsson, J. and Gobel, S. (1981), An HRP study of the central projections of primary trigeminal neurons which innervate tooth pulp in the cat, *Brain Res.*, **210**, 1-16.
- Arvidsson, J. and Pfaller, K. (1990), Central projections of C4-C8 dorsal root ganglia in the rat studied by anterograde transport of WGA-HRP, *J. Comp. Neurol.*, **292**, 349-362.
- Arvidsson, J. and Rice, F.L. (1991), Central projections of primary sensory neurons innervating different parts of the vibrissae follicles and intervibrissal skin on the mystacial pad of the rat, *J. Comp. Neurol.*, **309**, 1-16.
- Arvidsson, U., Johnson, H., Piehl, F., Cullheim, S., Hökfelt, T., Risling, M., Terenius, L. and Ulfhake, B. (1990), Peripheral nerve induces increased levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in axotomized motoneurons, *Exp. Brain Res.*, **79**, 212-216.
- Åström, K.E. (1953), On the central course of afferent fibers in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **29**, 106, 209-320.
- Azerad, J. and Woda, A. (1976), Tooth pulp projection to the trigeminal complex and jaw opening reflex in the cat, *J. Biol. Buccale*, **4**, 109-115.
- Azerad, J., Woda, A. and Albe-Fessard, D. (1982), Physiological properties of neurons in different parts of the cat trigeminal sensory complex, *Brain Res.*, **246**, 7-21.
- Baleyrier, C. and Mauguier, F. (1978), Projections of the ascending somesthetic pathways to the cat superior colliculus visualized by the horseradish peroxidase technique, *Exp. Brain Res.*, **31**, 43-50.
- Banna, N.R., Saadé, N.E., Atweh, S.F. and Jabbur, S.J. (1986), Prolonged discharge of wide dynamic range spinal neurons evoked by formaldehyde injected in their cutaneous receptive fields, *Exp. Neurol.*, **93**, 275-278.
- Bánvölgyi, Á., Pozsgai, G., Brain, S.D., Helyes, Z.S., Szolcsányi, J., Ghosh, M., Meleg, B. and Pintér, E. (2004), Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice, *Neuroscience*, **125**, 449-459.
- Baranowski, R., Lynn, B. and Pini, A. (1986), The effects of locally applied capsaicin on conduction in cutaneous nerves of four mammalian species, *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 267-276.
- Barka, T., Gubits, R.M. and van der Noen, H.M. (1986), β -Adrenergic stimulation of c-fos gene expression in the mouse

- submandibular gland, *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2984-2989.
- Bartel, D.P., Sheng, M., Lau, L.F. and Greenberg, M.E. (1989), Growth factors and membrane depolarization activate distinct patterns of early response gene expression: dissociation of *fos* and *jun* induction, *Genes Dev.*, **3**, 304-313.
- Batten, T.F.C., Appenteng, K. and Saha, S. (1988), Visualisation of CGRP and ChAT-like immunoreactivity in identified trigeminal neurones by combined peroxidase and alkaline phosphatase enzymatic reactions, *Brain Res.*, **447**, 314-324.
- Beal, J.A. (1983), Identification of presumptive long axons neurons in the substantia gelatinosa of the rat lumbosacral spinal cord: a Golgi study, *Neurosci. Lett.*, **41**, 9-14.
- Beal, J.A. and Cooper, M.H. (1978), The neurons in the gelatinosal complex (Laminae II and III) of the monkey (*Macaca mulatta*): a Golgi study, *J. Comp. Neurol.*, **179**, 89-121.
- Beal, J.A., Penny, J.E. and Bicknell, H.R. (1981), Structural diversity of marginal (lamina I) neurons in the adult monkey (*Macaca mulatta*) lumbosacral spinal cord: a Golgi study, *J. Comp. Neurol.*, **202**, 237-254.
- Beitel, R.E. and Dubner, R. (1976), Response of unmyelinated (C) polymodal nociceptors to thermal stimuli applied to monkey's face, *J. Neurophysiol.*, **39**, 1160-1175.
- Bell, W.E. (1989), Orofacial pains: classification, diagnosis, management, Chicago, Yearbook Medical Publishers, 4th ed.
- Bennett-Clarke, C.A. and Chiaia, N.L. (1992), Normal development and effects of neonatal infraorbital nerve damage upon the innervation of the trigeminal brainstem complex by primary afferent fibers containing calcitonin gene-related peptide, *J. Comp. Neurol.*, **324**, 282-294.
- Bereiter, D.A. (1997), Morphine and somatostatin analogue reduce c-fos expression in trigeminal subnucleus caudalis produced by corneal stimulation in the rat, *Neuroscience*, **77**, 863-874.
- Bereiter, D.A. and Bereiter, D.F. (1996), NMDA and non-NMDA receptor antagonism reduces Fos-like immunoreactivity in central trigeminal neurons after corneal stimulation in the rat, *Neuroscience*, **73**, 249-258.
- Bereiter, D.A., Bereiter, D.F., Tonnessen, B.H. and Maclean, D.B. (1998), Selective blockade of substance P or neurokinin A receptors reduces the expression of c-fos in trigeminal subnucleus caudalis after corneal stimulation in the rat, *Neuroscience*, **83**, 525-534.
- Bereiter, D.A., Hathaway, C.B. and Benetti, A.P. (1994), Caudal portions of the spinal trigeminal complex are necessary for autonomic responses and display Fos-like immunoreactivity after corneal stimulation in the cat, *Brain Res.*, **657**, 73-82.
- Berman, A.L. (1968), The brain stem of the cat: A cytoarchitectonic atlas with stereotactic coordinates, Madison, University of Wisconsin Press.
- Berman, N.E., Puri, V., Chandrala, S., Puri, S., Macgregor, R., Liverman, C.S. and Klein, R.M. (2006), Serotonin in trigeminal ganglia of female rodents: relevance to menstrual migraine, *Headache*, **46**, 1230-1245.
- Bernard, J.F. and Besson, J.M. (1990), The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes, *J. Neurophysiol.*, **63**, 473-490.
- Bernard, J.F., Dallel, R., Raboisson, P., Villanueva, L. Le Bars, D. (1995), Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **353**, 480-505.
- Besson, J.M. and Chaouch, A. (1987), Peripheral and spinal mechanisms of nociception, *Physiol. Rev.*, **67**, 67-186.
- Bessou, P. and Perl, E.R. (1969), Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli, *J. Neurophysiol.*, **32**, 1025-1043.
- Bester, H., Allchorne, A.J. and Woolf, C.J. (1998), Recovery of C-fiber-induced extravasation following peripheral nerve injury in the rat, *Exp. Neurol.*, **154**, 628-636.
- Bester, H., Matsumoto, N., Besson, J.-M. and Bernard, J.-F. (1997), Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-Fos study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **383**, 439-458.
- Beurman, R.W. (1975), Neurons in trigeminal nucleus and reticular formation excited by ethmoidal nerve stimulation, *Brain Res.*, **92**, 479-484.
- Bevan, S. and Geppetti, P. (1994), Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves, *Trends Neurosci.*, **17**, 509-512.
- Bevan, S. and Szolcsányi, J. (1990), Sensory neuron-specific actions of capsaicin:

- Mechanisms and applications, *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 330-333.
- Bevan, S. and Yeats, J. (1991), Protons activate a cation conductance in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones, *J. Physiol.*, **433**, 145-161.
- Bicknell, H.R. and Beal, J.A. (1981), Star shaped neurons in the substantia gelatinosa of the adult cat spinal cord, *Neurosci. Lett.*, **22**, 37-41.
- Biedenbach, M.A., Van Hassel, H.J. and Brown, A.C. (1979), Tooth pulp-driven neurons in somatosensory cortex of primates: role in pain mechanisms including a review of the literature, *Pain*, **7**, 31-50.
- Biró, T., Brodie, C., Modarres, S., Lewin, N.E., Ács, P. and Blumberg, P.M. (1998a), Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **56**, 89-98.
- Biró, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N.E., Brodie, C., Ács, G., Ács, P., Paus, R. and Blumberg, P.M. (1998b), Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells, *Blood*, **91**, 1332-1340.
- Bishop, M.A. (1981), A fine-structural survey of the pulpal innervation in the rat mandibular incisor, *Am. J. Anat.*, **160**, 213-229.
- Bittiger, H., Basic aspects of inhibitory transmitter amino acids in spasticity and pain. In: Marsden, D. (ed.): *Treating spasticity: pharmacological advances*, Toronto, Hans Huber, 1989, pp. 20-30.
- Bittner, M.A. and Lahann, T.R. (1984), Biphasic time-course of capsaicin-induced substance P depletion: failure to correlate with thermal analgesia in the rat, *Brain Res.*, **322**, 305-309.
- Bohmann, D., Admon, A., Turner, D.R. and Tjian, R. (1988), Transcriptional regulation by the AP-1 family of enhancer-binding proteins: a nuclear target for signal transduction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **53**, 695-700.
- Boissonade, F.M. and Matthews, B. (1993), Responses of trigeminal brain stem neurons and the digastric muscle to tooth pulp stimulation in awake cats, *J. Neurophysiol.*, **69**, 174-186.
- Boissonade, F.M., Sharkey, K.A. and Lucier, G.E. (1993), Trigeminal nuclear complex of the ferret: anatomical and immunohistochemical studies, *J. Comp. Neurol.*, **329**, 291-312.
- Boucher, Y., Simons, C.T., Cuellar, J.M., Jung, S.W., Carstens, M.I. and Carstens, E. (2003), Activation of brain stem neurons by irritant chemical stimulation of the throat assessed by c-fos immunohistochemistry, *Exp. Brain Res.*, **148**, 211-218.
- Brain, S.D. and Williams, T.J. (1985), Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability, *Br. J. Pharmacol.*, **86**, 855-860.
- Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R. and MacIntyre, I. (1985), Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator, *Nature*, **313**, 54-56.
- Bratzlavsky, M., De Boever, J. and van der Eecken, H. (1976), Tooth pulpal reflexes in jaw musculature in man, *Arch. Oral Biol.*, **21**, 491-493.
- Bravo, R., Neuberger, M., Burckhardt, J., Almendral, J., Wallich, R. and Müller, R. (1987), Involvement of common and cell type specific pathways in c-fos gene control: stable induction by cAMP in macrophages, *Cell*, **48**, 251-260.
- Brichta, A.M. and Grant, G., Cytoarchitectural organization of the spinal cord. In: Paxinos, P. (ed.): *The Rat Nervous System, Vol. 2, Hindbrain and Spinal Cord*, Sydney, Academic Press, 1985, pp. 293-301.
- Brodal, A. (1981), *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*, New York, Oxford Univ. Press, pp. 1053.
- Brodin, E., Gazelius, B., Olgart, L. and Nilsson, G. (1981), Tissue concentration and release of substance P-like immunoreactivity in the dental pulp, *Acta Physiol. Scand.*, **111**, 141-149.
- Broton, J.G. and Rosenfeld, J.P. (1982), Rostral trigeminal projections signal perioral facial pain, *Brain Res.*, **243**, 395-400.
- Broton, J.G. and Rosenfeld, J.P. (1985), Effects of trigeminal tractotomy on facial thermal nociception in the rat, *Brain Res.*, **333**, 63-72.
- Broton, J.G. and Rosenfeld, J.P. (1986), Cutting rostral trigeminal complex projections preferentially affects perioral nociception in the rat, *Brain Res.*, **397**, 1-8.
- Broton, J.G., Hu, J.W. and Sessle, B.J. (1988), Effects of temporomandibular joint stimulation on nociceptive and nonnociceptive neurons of the cat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn), *J. Neurophysiol.*, **59**, 1575-1589.
- Brown, A.G. (1981), *Organization in the spinal cord*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 238.
- Brown, J.H., Kissel, J.W. and Lish, P.M. (1968), Studies on the acute inflammatory response. I. Involvement of the central nervous system in certain models of

- inflammation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **160**, 231-242.
- Brown, J.L., Liu, H., Maggio, J.E., Vigna, S.R., Mantyh, P.W. and Basbaum, A.I. (1995), Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis, *J. Comp. Neurol.*, **356**, 327-344.
- Brown, J.W. (1958), The development of subnucleus caudalis of the nucleus of the spinal tract of V, *J. Comp. Neurol.*, **110**, 105-133.
- Bruce, L.L., McHaffie, J.G. and Stein, B.E. (1987), The organization of trigeminothalamic and trigeminothalamic neurons in rodents: a double-labeling study with fluorescent dyes, *J. Comp. Neurol.*, **262**, 315-330.
- Buck, S.H. and Burks, T.F. (1986), The neuropharmacology of capsaicin: A review of some recent observations, *Pharmacol. Rev.*, **38**, 179-226.
- Buck, S.H., Walsh, J.H., Davis, T.P., Brown, M.R., Yamamura, H.I. and Burks, T.F. (1983), Characterization of the peptide and sensory neurotoxic effects of capsaicin in the guinea pig, *J. Neurosci.*, **3**, 2064-2074.
- Bullitt, E. (1991), Somatotopy of spinal nociceptive processing, *J. Comp. Neurol.*, **312**, 279-290.
- Bullitt, E., Lee, C.L., Light, A.R. and Willcockson, H. (1992), The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord, *Brain Res.*, **580**, 172-179.
- Burgess, P.R. and Perl, E.R. (1967), Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin, *J. Physiol.*, **190**, 541-562.
- Burgess, P.R. and Perl, E.R., Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. In: Iggo, A. (ed.): Handbook of sensory physiology, somatosensory system, Heidelberg, Springer, 1973, 2, pp. 29-78.
- Burstein, R., Cliffer, K.D. and Giesler, G.J. Jr. (1990), Cells of origin of the spinothalamic tract in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **291**, 329-344.
- Burt, D.R. and Kamatchi, G.L. (1991), GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.*, **5**, 2916-2923.
- Burton, H. and Craig, A.D. (1979), Distribution of trigeminothalamic projection cells in cat and monkey, *Brain Res.*, **161**, 515-521.
- Burton, H. and Loewy, A.D. (1977), Projections to the spinal cord from medullary somatosensory relay nuclei, *J. Comp. Neurol.*, **173**, 773-792.
- Bushnell, M.C., Duncan, G.H., Dubner, R. and He, L.F. (1984), Activity of trigeminothalamic neurons in medullary dorsal horn of awake monkeys trained in a thermal discrimination task, *J. Neurophysiol.*, **52**, 170-187.
- Byers, M.R., Chudler, E.H. and Iadarola, M.J. (2000), Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of Fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem, *Brain Res.*, **861**, 191-207.
- Cadet, R., Pajot, J., Papon, A. and Woda, A. (1998), Is there a correlation between scores of nociceptive behavioral responses to formalin injections given at different body sites in the rat?, *Neurosci. Lett.*, **242**, 123-126.
- Cajal, S.R. (1909), Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Vol. I, Paris, Maloine.
- Cameron, A.A., Leah, J.D. and Snow, P.J. (1986), The electrophysiological and morphological characteristics of feline dorsal root ganglion cells, *Brain Res.*, **362**, 1-6.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A. and LaMotte, R.H. (1979), Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand, *J. Neurophysiol.*, **42**, 1669-1679.
- Capra, N.F., Ro, J.Y. and Wax, T.D. (1994), Physiological identification of movement-related neurons in the spinal trigeminal nucleus of cats, *Somatosens. Mot. Res.*, **11**, 77-88.
- Carlton, S.M., McNeill, D.L., Chung, K. and Coggeshall, R.E. (1988), Organization of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive terminals in the primate dorsal horn, *J. Comp. Neurol.*, **276**, 527-536.
- Carpenter, M.B. and Hanna, G.R. (1961), Fiber projections from the spinal trigeminal nucleus in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **117**, 117-131.
- Carstens, E., Saxe, I. and Ralph, R. (1995), Brainstem neurons expressing c-Fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue, *Neuroscience*, **69**, 939-953.
- Castle, N.A. (1992), Differential inhibition of potassium currents in rat ventricular myocytes by capsaicin, *Cardiovasc. Res.*, **26**, 1137-1144.
- Caston-Balderrama, A.L., Cameron, J.L. and Hoffman, G.E. (1998), Immunocytochemical localization of Fos in perfused nonhuman primate brain tissue: Fixation and antisera selection, *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 547-556.

- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. and Julius, D. (1997), The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, **389**, 816-824.
- Cervero, F., The superficial dorsal horn. In: Cervero, F., Bennett G.J. and Headley (eds.): *Processing of Sensory Information in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord*, New York, Plenum, 1989, pp. 1-9.
- Chamberlin, N.L. and Saper, C.B. (1992), Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **326**, 245-262.
- Chang, L.S., Squinto, S.P. and Harlan, R.E. (1988), Morphine activation of c-fos expression in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 698-704.
- Chang, M.M. and Leeman, S.E. (1970), Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P, *J. Biol. Chem.*, **245**, 4784-4790.
- Chan-Palay, V. (1978a), The paratrigeminal nucleus. I. Neurons and synaptic organization, *J. Neurocytol.*, **7**, 405-418.
- Chan-Palay, V. (1978b), The paratrigeminal nucleus. II. Identification and inter-relations of catecholamine axons, indoleamine axons, and substance P immunoreactive cells in the neuropil, *J. Neurocytol.*, **7**, 419-442.
- Chatrian, G.E., Fernandes de Lima, V.M., Lettich, R.C., Canfield, R.C., Miller, R.C. and Soso, M.J. (1982), Electrical stimulation of tooth pulp in humans. II. Qualities of sensations, *Pain*, **14**, 233-246.
- Chattipakorn, S., Chattipakorn, N., Light, A.R., Narhi, M. and Maixner, W. (2005), Comparison of Fos expression within the ferret's spinal trigeminal nuclear complex evoked by electrical or noxious-thermal pulpal stimulation, *J. Pain*, **6**, 569-580.
- Chattipakorn, S.C., Light, A.R., Willcockson, H.H., Narhi, M. and Maixner, W. (1999), The effect of fentanyl on c-fos expression in the trigeminal brainstem complex produced by pulpal heat stimulation in the ferret, *Pain*, **82**, 207-215.
- Chattipakorn, S.C., Sigurdsson, A., Light, A.R., Narhi, M. and Maixner, W. (2002), Trigeminal c-Fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets, *Pain*, **99**, 61-69.
- Chen, J., Koyama, N. and Yokota, T. (1996), Effects of subcutaneous formalin on responses of dorsal horn wide dynamic range neurons and primary afferent neurons in the cat, *Pain Res.*, **11**, 71-83.
- Chéry-Croze, S., Godinot, F., Jourdan, G., Bernard, C. and Chayvialle, J.A. (1985), Capsaicin in adult frogs: effects on nociceptive responses to cutaneous stimuli and on nervous tissue concentrations of immunoreactive substance P, somatostatin and cholecystokinin, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **331**, 159-165.
- Cheunsuang, O., Maxwell, D. and Morris, R. (2002), Spinal lamina I neurones that express neurokinin 1 receptors: II. Electrophysiological characteristics, responses to primary afferent stimulation and effects of a selective mu-opioid receptor agonist, *Neuroscience*, **111**, 423-434.
- Chiang, C.Y., Hu, B., Hu, J.W., Dostrovsky, J.O. and Sessle, B.J. (2002), Central sensitization of nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis depends on integrity of subnucleus caudalis, *J. Neurophysiol.*, **88**, 256-64.
- Chiang, C.Y., Hu, J.W. and Sessle, B.J. (1994), Parabrachial area and nucleus raphe magnus-induced modulation of nociceptive and nonnociceptive trigeminal subnucleus caudalis neurons activated by cutaneous or deep inputs, *J. Neurophysiol.*, **71**, 2430-2445.
- Chiu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. and Karin, M. (1988), The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes, *Cell*, **54**, 541-552.
- Christensen, B.N. and Perl, E.R. (1970), Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn, *J. Neurophysiol.*, **33**, 293-307.
- Chung, J.M., Kenshalo, D.R., Gerhart, K.D. and Willis, W.D. (1979), Excitation of primate spinothalamic neurons by cutaneous C-fiber volleys, *J. Neurophysiol.*, **42**, 1354-1369.
- Chung, J.M., Lee, K.H., Hori, Y. and Willis, W.D. (1985), Effects of capsaicin applied to a peripheral nerve on the responses of primate spinothalamic tract cells, *Brain Res.*, **329**, 27-38.
- Chung, K., Lee, W.-T. and Carlton, S.M. (1988), The effects of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn, *Neurosci. Lett.*, **90**, 27-32.
- Clapham, D.E. (2003), TRP channels as cellular sensors, *Nature*, **426**, 517-524.
- Clarke, R.W. and Matthews, B. (1990), The thresholds of the jaw opening reflex and

- trigeminal brainstem neurons to tooth pulp stimulation in acutely and chronically prepared cats, *Neuroscience*, **36**, 105-114.
- Clarke, R.W., The trigeminal nuclei in pain. In: Holden, A.B. and Winlow, W. (eds.): The neurobiology of pain, Manchester, Manchester University Press, 1984, pp. 70-81.
- Clavelou, P., Dallel, R., Orliaguet, T., Woda, A. and Raboisson, P. (1995), The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations, *Pain*, **62**, 295-301.
- Clavelou, P., Pajot, J., Dallel, R. and Raboisson, P. (1989), Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat, *Neurosci. Lett.*, **103**, 349-353.
- Coderre, T.J. and Melzack, R. (1992a), The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury, *J. Neurosci.*, **12**, 3665-3670.
- Coderre, T.J. and Melzack, R. (1992b), The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury, *J. Neurosci.*, **12**, 3671-3675.
- Coderre, T.J., Katz, J., Vaccarino, A.L. and Melzack, R. (1993), Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence, *Pain*, **52**, 259-285.
- Coderre, T.J., Vaccarino, A.L. and Melzack, R. (1990), Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection, *Brain Res.*, **535**, 155-158.
- Cohen, D.R. and Curran, T. (1988), *fra-1*: a serum inducible cellular immediate-early gene that encodes a *fos*-related antigen, *Mol. Cell Biol.*, **8**, 2063-2069.
- Cohen, D.R., Ferreira, P.C.P., Gentz, R., Franza, B.R. Jr. and Curran, T. (1989), The product of a *fos*-related gene, *fra-1*, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes, *Genes Dev.*, **3**, 173-184.
- Coimbra, F. and Coimbra, A. (1994), Dental noxious input reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat, as shown by *c-fos* expression upon thermal or mechanical stimulation, *Neurosci. Lett.*, **173**, 201-204.
- Comb, M., Birnberg, N.C., Seasholtz, A., Herbert, E. and Goodman, H.M. (1986), A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element, *Nature*, **323**, 353-356.
- Conrath, M., Taquer, H., Pohl, M. and Carayon, A. (1989), Immunocytochemical evidence for calcitonin gene-related peptide-like neurons in the dorsal horn and lateral spinal nucleus of the rat cervical spinal cord, *J. Chem. Neuroanat.*, **2**, 335-347.
- Contreras, R.J., Beckstead, R.M. and Norgren, R. (1982), The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat, *J. Auton. Nerv. Syst.*, **6**, 303-322.
- Courville, J. and Saint-Cyr, J.A. (1978), Modification of the horseradish peroxidase method avoiding fixation, *Brain Res.*, **142**, 551-558.
- Craig, A.D. (2003), Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing, *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 1-30.
- Craig, A.D. and Kniffki, K.D. (1985), Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat, *J. Physiol.*, **365**, 197-221.
- Crosby, E.C. and Yoss, R.E. (1954), The phylogenetic continuity of neural mechanisms of illustrated by the spinal tract of V and its nucleus, *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, **33**, 174-208.
- Cruz, F., Lima, D. and Coimbra, A. (1987), Several morphological types of terminal arborizations of primary afferents in laminae I-II of the rat spinal cord, as shown after HRP labelling and Golgi impregnation, *J. Comp. Neurol.*, **261**, 221-236.
- Cuello, A.C., Polak, J.M. and Pearse, A.G.E. (1976), Substance P: a naturally occurring transmitter in human spinal cord, *Lancet*, **2**, 1054-1056.
- Curran, T., The *fos* oncogene. In: Reddy, E.P., Skalka, A.M. and Curran, T. (eds.): The oncogene handbook, Amsterdam, Elsevier, 1988, pp. 307-325.
- Curran, T. and Franza, B.R. Jr. (1988), Fos and Jun: The AP-1 connection, *Cell*, **55**, 395-397.
- Curran, T. and Morgan, J.I. (1985), Superinduction of *c-fos* by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines, *Science*, **229**, 1265-1268.
- Curran, T. and Morgan, J.I. (1986), Barium modulates *c-fos* expression and post-translational modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8521-8524.
- Curran, T. and Morgan, J.I. (1987), Memories of *fos*, *Bioessays*, **7**, 255-258.
- Curran, T. and Teich, N.M. (1982), Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein, *J. Virol.*, **42**, 114-122.
- Curran, T., Gordon, M.B., Rubino, K.L. and Sambucetti, L.C. (1987), Isolation and characterization of the *c-fos* (rat) cDNA and

- analysis of post-translational modification *in vitro*, *Oncogene*, **2**, 79-84.
- Curran, T., MacConnell, W.P., Van Straaten, F. and Verma, I.M. (1983), Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the *v-fos* gene from mouse and human cells, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 914-921.
- Curran, T., Miller, A.D., Zokas, L. and Verma, I.M. (1984), Viral and cellular *fos* proteins: a comparative analysis, *Cell*, **36**, 259-268.
- Curran, T., Van Beveren, C., Ling, N. and Verma, I.M. (1985), Viral and cellular *fos* proteins are complexed with a 39,000 dalton cellular protein, *Mol. Cell Biol.*, **5**, 167-172.
- Dallel, R., Clavelou, P. and Woda, A. (1989), Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat, *Exp. Neurol.*, **106**, 78-84.
- Dallel, R., Dualé, C. and Molat, J.L. (1998), Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis, *J. Neurosci.*, **18**, 3529-3536.
- Dallel, R., Raboisson, P., Auroy, P. and Woda, A. (1988), The rostral part of the trigeminal sensory complex is involved in orofacial nociception, *Brain Res.*, **448**, 7-19.
- Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M. and Woda, A. (1995), Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin, *Pain*, **61**, 11-16.
- Dallel, R., Raboisson, P., Woda, A. and Sessle, B.J. (1990), Properties of nociceptive and non nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis of the rat, *Brain Res.*, **521**, 95-106.
- Dallel, R., Ricard, O. and Raboisson, P. (2004), Organization of parabrachial projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: an anterograde tracing study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **470**, 181-191.
- Dalsgaard, C.J., Heagerstrand, A., Brodin, E., Theodorsson-Norheim, E. and Hökfelt, T. (1985), Neurokinin A-like immunoreactivity in rat primary sensory neurons: coexistence with substance P, *Histochemistry*, **83**, 37-39.
- Dam, T.V., Martinelli, B. and Quirion, R. (1990), Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [3H]-[Sar⁹,Met(O₂)¹¹]-substance P, *Brain Res.*, **531**, 333-337.
- Darian-Smith, I., Rowe, M.J. and Sessle, B.J. (1968), "Tactile" stimulus intensity: information transmission by relay neurons in different trigeminal nuclei, *Science*, **160**, 791-794.
- Darian-Smith, I. (1966), Neural mechanisms of facial sensation, *Int. Rev. Neurobiol.*, **9**, 301-395.
- Darian-Smith, I. and Johnson, K.O. (1977), Temperature sense in the primate, *Br. Med. Bull.*, **33**, 143-148.
- Darian-Smith, I., Proctor, R. and Ryan, R.D. (1963), A single neurone investigation of somatotopic organization within the cat brain stem nuclei, *J. Physiol.*, **168**, 147-157.
- Davies, W.I.R., Scott, D. Jr., Veterström, K. and Vyklicky, L. (1971), Depolarization of the tooth pulp afferent terminals in the brain stem of the cat, *J. Physiol.*, **218**, 515-532.
- De Chazeron, I., Raboisson, P. and Dallel, R. (2004), Organization of diencephalic projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: an anterograde tracing study in the rat, *Neuroscience*, **127**, 921-928.
- Deal, C.L., Schnitzer, T.J., Lipstein, E., Seibold, J.R., Stevens, R.M., Levy, M.D., Albert, D. and Renold, F. (1991), Treatment of arthritis with topical capsaicin: A double-blind trial, *Clin. Ther.*, **13**, 383-395.
- Del Fiacco, M., Levanti, M.C., Dessi, M.L. and Zucca, G. (1987), The human hippocampal formation and parahippocampal gyrus: Localization of substance P-like immunoreactivity in newborn and adult postmortem tissue, *Neuroscience*, **21**, 141-150.
- Dennis, S.G. and Melzack, R. (1979), Comparison of phasic and tonic pain in animals, *Adv. Pain Res. Ther.*, **3**, 740-760.
- Denny-Brown, D. and Yanagisawa, N. (1973), The function of the descending root of the fifth nerve, *Brain*, **96**, 783-814.
- Dickenson, A.H. and Le Bars, D. (1983), Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) involve trigeminothalamic and spinothalamic neurones in the rat, *Exp. Brain Res.*, **49**, 174-80.
- Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F. (1987a), Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones, *Neurosci. Lett.*, **83**, 207-211.
- Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F. (1987b), Subcutaneous formalin induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate pre- or post-formalin, *Pain*, **30**, 349-360.
- Dickenson, A.H., Hellon, R.F. and Woolf, C.J. (1981), Tooth pulp input to the spinal trigeminal nucleus: A comparison of inhibitions following segmental and raphe magnus stimulation, *Brain Res.*, **214**, 73-87.

- DiFiglia, M., Aronin, N. and Leeman, S.E. (1982), Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord, *Neuroscience*, **7**, 1127-1139.
- Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Mingomataj, E., Peiser, C., Heppt, W., Dinh, S., Arck, P.C., Klapp, B.F. and Fischer, A. (2003), Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa, *Neuropeptides*, **37**, 245-250.
- Dini, D., Bertelli, G., Gozza, A. and Forno, G.G. (1993), Treatment of the postmastectomy pain syndrome with topical capsaicin, *Pain*, **54**, 223-226.
- Distel, R.J., Ro, H.S., Rosen, B.S., Groves, D.L. and Spiegelman, B.M. (1987), Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of *c-fos*, *Cell*, **49**, 835-844.
- Donaldson, L., Hand, P.J. and Morrison, A.R. (1975), Cortical-thalamic relationships in the rat, *Exp. Neurol.*, **47**, 448-458.
- Dong, W.K. and Chudler, E.H. (1984), Origins of tooth pulp-evoked far-field and early near-field potentials in the cat, *J. Neurophysiol.*, **51**, 859-889.
- Dostrovsky, J.O. and Hellon, R.F. (1978), The representation of facial temperature in the caudal trigeminal nucleus of the cat, *J. Physiol.*, **277**, 29-47.
- Dostrovsky, J.O., Sessle, B.J. and Hu, J.W. (1981), Presynaptic excitability changes produced in brain stem endings of tooth pulp afferents by raphe and other central and peripheral influences, *Brain Res.*, **218**, 141-160.
- Dragunow, M. and Faull, R.L.M. (1990), MK-801 induces *c-fos* protein in thalamic and neocortical neurons of rat brain, *Neurosci. Lett.*, **111**, 39-45.
- Dragunow, M. and Robertson, H.A. (1987), Kindling stimulation induces *c-fos* protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus, *Nature*, **329**, 441-442.
- Dragunow, M. and Robertson, H.A. (1988a), Localization and induction of *c-fos* protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons, *Brain Res.*, **440**, 252-260.
- Dragunow, M. and Robertson, H.A. (1988b), Brain injury induces *c-fos* protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain, *Brain Res.*, **455**, 295-299.
- Dragunow, M., Faull, R.L.M. and Jansen, K.L.R. (1990), MK-801, an antagonist of NMDA receptors, inhibits injury-induced *c-fos* protein accumulation in rat brain, *Neurosci. Lett.*, **109**, 128-133.
- Dragunow, M., Robertson, H.A. and Robertson, G.S. (1988), Amygdala kindling and *c-fos* protein(s), *Exp. Neurol.*, **102**, 261-263.
- Draisci, G. and Iadarola, M.J. (1989), Temporal analysis of increases in *c-fos*, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **6**, 31-37.
- Dray, A., Bettaney, J. and Forster, P. (1989), Capsaicin desensitization of peripheral nociceptive fibers does not impair sensitivity to other noxious stimuli, *Neurosci. Lett.*, **99**, 50-54.
- Dubner, R. and Bennett, G.J. (1983), Spinal and trigeminal mechanisms of nociception, *Annu. Rev. Neurosci.*, **6**, 381-418.
- Dubner, R. and Hu, J.W. (1977), Myelinated (A-delta) nociceptive afferents innervating the monkey's face, *J. Dent. Res.*, **56**, A167.
- Dubner, R., Gobel, S. and Price, D.D., Peripheral and central trigeminal pain pathways. In: Bonica, J.J. and Albe-Fessard, D. (eds.): *Advances in pain research and therapy*, New York, Raven, 1, 1976, pp. 137-148.
- Dubner, R., Kenshalo, D.R., Maixner, W., Bushnell, M.C. and Oliveras, J.L. (1989), The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli, *J. Neurophysiol.*, **62**, 450-457.
- Dubner, R., Price, D.D., Beitel, R.E. and Hu, J.W., Peripheral neural correlates of behavior in monkey and human related to sensory-discriminative aspects of pain. In: Anderson, D.J. and Matthews, B. (eds.): *Pain in the trigeminal region*, Amsterdam, Elsevier North Holland, 1977, pp. 57-66.
- Dubner, R., Sessle, B.J. and Storey, A.T. (1978), *The neural basis of oral and facial function*, New York, Plenum.
- Dubuisson, D. and Dennis, S.G. (1977), The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain*, **4**, 161-174.
- Dutschmann, M. and Herbert, H. (1997), Fos expression in the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei after electrical stimulation of the trigeminal ethmoidal nerve and water stimulation of the nasal mucosa, *Exp. Brain Res.*, **117**, 97-110.
- Eisenberg, E., Vos, B.P. and Strassman, A.M. (1996), The peripheral antinociceptive effect of morphine in a rat model of facial pain, *Neuroscience*, **72**, 519-525.

- Eisenman, J., Landgren, S. and Novin, D. (1963), Functional organization in the main sensory trigeminal nucleus and in the rostral subdivision of the nucleus of the spinal trigeminal tract in the cat, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **59**, 214, 1-44.
- English, A.W., Tigges, J. and Lennard, P.R. (1985), Anatomical organization of long ascending propriospinal neurons in the cat spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **240**, 349-358.
- Eriksson, J., Bongenhielm, U., Kidd, E., Matthews, B. and Fried, K. (1998), Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury, *Neurosci. Lett.*, **254**, 37-40.
- Erjavec, F., Lembeck, F., Florjanc-Irman, T., Skofitsch, G., Donnerer, J., Saria, A. and Holzer, P. (1981), Release of histamine by substance P, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **317**, 67-70.
- Erlanger, J. and Gasser, H.S. (1937), Electrical signs of nervous activity, Philadelphia, Univ. Pennsylv. Press.
- Erzurumlu, R.S. and Killackey, H.P. (1980), Diencephalic projections of the subnucleus interpolaris of the brainstem trigeminal complex in the rat, *Neuroscience*, **5**, 1891-1901.
- Esser, M.J., Pronych, S.P. and Allen, G.V. (1998), Trigeminal-reticular connections: possible pathways for nociception-induced cardiovascular reflex responses in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **391**, 526-544.
- Falconer, M.A. (1949), Intramedullary trigeminal tractotomy and its place in the treatment of facial pain, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **12**, 297-311.
- Falls, W.M. (1984), The morphology of neurons in trigeminal nucleus oralis projecting to the medullary dorsal horn (trigeminal nucleus caudalis): A retrograde horseradish peroxidase and Golgi study, *Neuroscience*, **13**, 1279-1298.
- Falls, W.M. (1988), Synaptic organization of primary axons in trigeminal nucleus oralis, *J. Electron. Microsc. Tech.*, **10**, 213-227.
- Falls, W.M. and Alban, M.M. (1986a), Morphological features of identified trigeminocerebellar projection neurons in the border zone of rat trigeminal nucleus oralis, *Somatosens. Mot. Res.*, **4**, 1-12.
- Falls, W.M. and Alban, M.M. (1986b), Morphology and synaptic connections of small myelinated primary trigeminal axons arborizing among neurons in the border zone of rat trigeminal nucleus oralis, *Somatosens. Res.*, **4**, 97-110.
- Falls, W.M., Rice, R.E. and Vanwagner, J.P. (1985), The dorsomedial portion of trigeminal nucleus oralis (Vo) in the rat: cytology and projections to the cerebellum, *Somatosens. Res.*, **3**, 89-118.
- Fanselow, M.S. (1985), Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats, *Behav. Neurosci.*, **99**, 589-592.
- Feigin, A.M., Aronov, E.V., Bryant, B.P., Teeter, J.H. and Brand, J.G. (1995), Capsaicin and its analogs induce ion channels in planar lipid bilayers, *Neuroreport*, **6**, 2134-2136.
- Feil, K. and Herbert, H. (1995), Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei, *J. Comp. Neurol.*, **353**, 506-528.
- Fewtrell, C.M.S., Foreman, J.C., Jordan, C.C., Oehme, P., Renner, H. and Stewart, J.M. (1982), The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat, *J. Physiol. (London)*, **330**, 393-411.
- Fields, H.L. and Basbaum, A.I. (1978), Brainstem control of spinal pain transmission, *Ann. Rev. Physiol.*, **40**, 217-248.
- Fitzgerald, M. (1979), The spread of sensitization of polymodal nociceptors in the rabbit from nearby injury and by antidromic nerve stimulation, *J. Physiol.*, **297**, 207-216.
- Fitzgerald, M. (1987), Cutaneous primary afferent properties in the hind limb of the neonatal rat, *J. Physiol.*, **383**, 79-92.
- Fitzgerald, M. and Lynn, B. (1977), The sensitization of high threshold mechanoreceptors with myelinated axons by repeated heating, *J. Physiol.*, **365**, 549-563.
- Foreman, R.D., Schmidt, R.F. and Willis, W.D. (1979), Effects of mechanical and chemical stimulation of fine muscle afferents upon primate spinothalamic tract cells, *J. Physiol.*, **286**, 215-231.
- Fort, P., Luppi, P.H., Sakai, K., Salvat, D. and Jouvet, M. (1990), Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: A double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer, *J. Comp. Neurol.*, **301**, 262-275.
- Foster, R.W. and Ramage, A.G. (1981), The action of some chemical irritants on somatosensory receptors of the cat, *Neuropharmacology*, **20**, 191-198.
- Franco-Cereceda, A., Henke, H., Lundberg, J.M., Peterman, J.B., Hökfelt, T. and Fisher, J.A. (1987), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive

- substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin, *Peptides*, **8**, 399-410.
- Franza, B.R. Jr., Rauscher, F.J., Josephs, S.F. and Curran, T. (1988), The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites, *Science*, **239**, 1150-1153.
- Franza, B.R. Jr., Sambucetti, L.C., Cohen, D.R. and Curran, T. (1987), Analysis of Fos protein complexes and Fos-related antigens by high-resolution of two-dimensional gel electrophoresis, *Oncogene*, **1**, 213-221.
- Fried, K. and Hildebrand, C. (1981), Pulpal axons in developing, mature and aging feline permanent incisors. A study of electron microscopy, *J. Comp. Neurol.*, **203**, 23-36.
- Fried, K., Aldskogius, H. and Hildebrand, C. (1988), Proportion of unmyelinated axons in rat molar and incisor tooth pulps following neonatal capsaicin treatment and/or sympathectomy, *Brain Res.*, **463**, 118-123.
- Fried, K., Arvidsson, J., Robertson, B., Brodin, E. and Theodorsson, E. (1989), Combined retrograde tracing and enzyme/immunohistochemistry of trigeminal ganglion cell bodies innervating tooth pulps in the rat, *Neuroscience*, **33**, 101-109.
- Fromm, G.H. and Terrence, C.F. (1987), Comparison of L-baclofen and racemic baclofen in trigeminal neuralgia, *Neurology*, **37**, 1725-1728.
- Fromm, G.H., Sato, K. and Nakata, M. (1992), The action of GABA_B antagonists in the trigeminal nucleus of the rat, *Neuropharmacology*, **31**, 475-480.
- Fromm, G.H., Terrence, C.F. and Chattha, A.S. (1984), Baclofen is the treatment of trigeminal neuralgia: double blind study and long-term follow-up, *Ann. Neurol.*, **15**, 240-244.
- Fu, K.-Y., Light, A.R. and Maixner, W. (2001), Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw, *J. Pain*, **2**, 2-11.
- Fujiyoshi, Y., Yamashiro, T., Deguchi, T., Sugimoto, T. and Takano-Yamamoto, T. (2000), The difference in temporal distribution of c-Fos immunoreactive neurons between the medullary dorsal horn and the trigeminal subnucleus oralis in the rat following experimental tooth movement, *Neurosci. Lett.*, **283**, 205-208.
- Fukushima, T. and Kerr, F.W.L. (1979), Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections, *J. Comp. Neurol.*, **183**, 169-184.
- Furchgott, R.F. (1984), The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 175-197.
- Fusco, B.M., Geppetti, P., Fanciullacci, M. and Sicuteri, F. (1991), Local application of capsaicin for the treatment of cluster headache and idiopathic trigeminal neuralgia, *Cephalalgia*, **11**, 234-235.
- Gaillard, J.M., Benzodiazepines and GABA-ergic transmission. In: Kryger, M.H., Roth, T. and Dement, W.C. (eds.): Principles and practice of sleep medicine, Philadelphia, Saunders, 1989, pp. 213-218.
- Gallagher, A.W., Chahl, L.A. and Lynch, A.M. (1992), Distribution of substance P-like immunoreactivity in guinea pig central nervous system, *Brain Res. Bull.*, **29**, 199-207.
- Gamse, R. (1982), Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **320**, 205-216.
- Gamse, R. and Saria, A. (1985), Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide, *Eur. J. Pharmacol.*, **114**, 61-66.
- Gamse, R. and Saria, A. (1986), Nociceptive behavior after intrathecal injections of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in mice, *Neurosci. Lett.*, **70**, 143-147.
- Gamse, R., Holzer, P. and Lembeck, F. (1980), Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin, *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 207-213.
- Gamse, R., Leeman, S.E., Holzer, P. and Lembeck, F. (1981), Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of the rat, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **317**, 140-148.
- Gasser, H.S. (1955), Properties of dorsal root unmyelinated fibers on the two sides of the ganglion, *J. Gen. Physiol.*, **38**, 709-728.
- Gehlert, D.R. and Gackenhaimer, S.L. (1997), Differential distribution of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors in rat and guinea-pig brains, *Neuroscience*, **76**, 215-224.
- Gentz, R., Rauscher, F.J. 3rd., Abate, C. and Curran, T. (1989), Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains, *Science*, **243**, 1695-1699.

- Georgopoulos, A.P. (1976), Functional properties of primary afferent units probably related to pain mechanisms in primate glabrous skin, *J. Neurophysiol.*, **39**, 71-83.
- Geppetti, P., Frilli, S., Renzi, D., Santicioli, P., Maggi, C.A., Theodorsson, E. and Fanciullacci, M. (1988a), Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in various rat tissues: correlation with substance P and other tachykinins and sensitivity to capsaicin, *Regul. Pept.*, **23**, 289-298.
- Geppetti, P., Fusco, B., Marabini, S., Maggi, C.A., Fanciullacci, M. and Sicuteri, F. (1988b), Secretion, pain and sneezing induced by the application of capsaicin to the nasal mucosa in man, *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 509-514.
- Gerard, M.W. (1923), Afferent impulses of the trigeminal nerve. The intramedullary course of the painful, thermal, and tactile impulses, *Arch. Neurol. Psychiat.*, **9**, 306-338.
- Gibbins, I.L., Furness, J.B. and Costa, M. (1987), Pathway-specific patterns of the coexistence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea pig, *Cell Tissue Res.*, **248**, 417-437.
- Gibbins, I.L., Furness, J.B., Costa, M., MacIntyre, I., Hillyard, C.J. and Girgis, S. (1985), Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs, *Neurosci. Lett.*, **57**, 125-130.
- Gibson, S.J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Sabate, I.M., Muldery, P.M., Ghatei, M.A., McGregor, G.P., Morrison, J.F.B., Kelly, J.S., Evans, R.M. and Rosenfeld, M.G. (1984), Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species, *J. Neurosci.*, **4**, 3101-3111.
- Glinsukon, T., Stitmunnaithum, V., Toskulkao, C., Baranawuti, T. and Tangkrisanavinont, V. (1980), Acute toxicity of capsaicin in several animal species, *Toxicol.*, **18**, 215-220.
- Gobel, S. (1975a), Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus, *J. Comp. Neurol.*, **162**, 397-415.
- Gobel, S. (1975b), Neurons with two axons in the substantia gelatinosa layer of the spinal trigeminal nucleus of the adult cat, *Brain Res.*, **88**, 333-338.
- Gobel, S. (1978a), Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis), *J. Comp. Neurol.*, **180**, 375-394.
- Gobel, S. (1978b), Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis), *J. Comp. Neurol.*, **180**, 395-414.
- Gobel, S. and Binck, J.M. (1977), Degenerative changes in primary trigeminal axons and in neurons in nucleus caudalis following tooth pulp extirpations in the cat, *Brain Res.*, **132**, 347-354.
- Gobel, S. and Purvis, M.B. (1972), Anatomical studies of the organization of the spinal V nucleus: the deep bundles and the spinal tract, *Brain Res.*, **48**, 27-44.
- Gobel, S., Falls, W.M. and Hockfield, S., The division of the dorsal and ventral horns of the mammalian caudal medulla into eight layers using anatomical criteria. In: Anderson, D.J. and Matthews, B. (eds.): Pain in the trigeminal region, Amsterdam, Elsevier, 1977, pp. 443-453.
- Gobel, S., Falls, W.M. and Humphrey, E. (1981a), Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axons arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons, *J. Neurosci.*, **1**, 1163-1179.
- Gobel, S., Hockfield, S. and Ruda, M.A., Anatomical similarities between medullary and spinal dorsal horns. In: Kawamura, Y. and Dubner, R. (eds.): Oral-Facial Sensory and Motor Functions, Tokyo, Quintessence, 1981b, pp.211-223.
- Goodman, R.H. (1990), Regulation of neuropeptide gene expression, *Annu. Rev. Neurosci.*, **13**, 111-127.
- Gordon, G., Landgren, S. and Seed, W.A. (1961), The functional characteristics of single cells in the caudal part of the spinal nucleus of the trigeminal nerve in the cat, *J. Physiol.*, **158**, 544-559.
- Graham, R.C. Jr. and Karnovsky, M.J. (1966), The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291-302.
- Graham, S.H., Sharp, F.R. and Dillon, W. (1988), Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons, *Neurology*, **38**, 1529-1533.
- Grant, F.C. (1955), Discussion on trigeminal tractotomy, *Clin. Neurosurg.*, **2**, 69-70.
- Grant, F.C., Groff, R.A. and Lewy, F.H. (1940), Section of the descending spinal root of the fifth cranial nerve, *Arch. Neurol. Psychiat.*, **43**, 498-509.

- Grant, G., Primary afferent projection to the spinal cord. In: Paxinos, G. (ed.), *The Rat Nervous System*, Vol. 2, Hindbrain and Spinal Cord, Sydney, Academic Press, 1985, pp. 303-310.
- Grant, G. and Ygge, J. (1981), Somatotopic organization of the thoracic spinal nerve in the dorsal horn demonstrated with transganglionic degeneration, *J. Comp. Neurol.*, **202**, 357-364.
- Graur, D., Hide, W.A. and Li, W.-H. (1991), Is the guinea-pig a rodent?, *Nature*, **351**, 649-652.
- Graven-Nielson, T., Arendt-Nielson, L., Svensson, P. and Jensen, T.S. (1997), Experimental muscle pain: a quantitative study of local and referred pain in humans following injection of hypertonic saline, *J. Musculoskeletal Pain*, **5**, 49-68.
- Green, B.G. (1989), Capsaicin sensitization and desensitization on the tongue produced by brief exposures to a low concentration, *Neurosci. Lett.*, **107**, 173-178.
- Greenberg, M.E., Greene, L.A. and Ziff, E.B. (1985), Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14101-14110.
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B. and Greene, L.A. (1986), Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription, *Science*, **234**, 80-83.
- Greenwood, L.F. (1973), An electrophysiological study of the central connections of primary afferent nerve fibers from the dental pulp in the cat, *Arch. Oral Biol.*, **18**, 771-785.
- Greenwood, L.F. and Sessle, B.J. (1976), Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues. II. Role of trigeminal nucleus caudalis in modulating responses to innocuous and noxious stimuli, *Brain Res.*, **117**, 227-238.
- Guard, S. and Watson, S.P. (1991), Tachykinin receptor types: Classification and membrane signalling mechanisms, *Neurochem. Int.*, **18**, 149-165.
- Guilbaud, G., Peschanski, M., Gautron, M. and Binder, D. (1980), Neurons responding to noxious stimulation in V.B. complex and caudal adjacent regions in the thalamus of the rat, *Pain*, **8**, 303-318.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. and Elde, R. (1999), Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB4 binding sites, *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 946-958.
- Guy, N., Chalus, M., Dallel, R. and Voisin, D.L. (2005), Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat, *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 741-754.
- Haley, J.E., Dickenson, A.H. and Schachter, M. (1989), Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat, *Neurosci. Lett.*, **97**, 198-202.
- Haley, J.E., Sullivan, A.F. and Dickenson, A.H. (1990), Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat, *Brain Res.*, **518**, 218-226.
- Hamby, W.B., Shinnars, B.M. and Marsh, I.A. (1948), Trigeminal tractotomy: observations on forty-eight cases, *Arch. Surg.*, **57**, 171-177.
- Hamilton, R.B., Ellenberger, H., Liskowsky, D. and Schneiderman, N. (1981), Parabrachial area as mediator of bradycardia in rabbits, *J. Auton. Nerv. Syst.*, **4**, 261-281.
- Hammond, D.L. and Ruda, M.A. (1991), Developmental alterations in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats, *J. Comp. Neurol.*, **312**, 436-450.
- Handwerker, H.O., Forster, C. and Kirchhoff, C. (1991), Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli, *J. Neurophysiol.*, **66**, 307-315.
- Handwerker, H.O., Iggo, A. and Zimmermann, M. (1975), Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli, *Pain*, **1**, 147-165.
- Hardy, H. and Heimer, L. (1977), A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde and anterograde axonal transport of HRP, *Neurosci. Lett.*, **5**, 235-240.
- Harper, A.A. and Lawson, S.N. (1985), Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones, *J. Physiol.*, **359**, 31-46.
- Harris, J.A. and Westbrook, R.F. (1994), Effects of midazolam and naloxone in rats tested for sensitivity/reactivity to formalin pain in a familiar, novel or aversively conditioned environment, *Psychopharmacology (Berl.)*, **115**, 65-72.
- Harris, N.C. and Ryall, R.W. (1988), Mustard oil excites but does not inhibit nociceptive dorsal horn neurones in the rat: a presumed effect on A-delta fibres, *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 180-184.

- Hartung, M., Leah, J. and Zimmermann, M. (1989), The excitation of cutaneous nerve endings in a neuroma by capsaicin, *Brain Res.*, **499**, 363-366.
- Hathaway, C.B., Hu, J.W. and Bereiter, D.A. (1995), Distribution of fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint, *J. Comp. Neurol.*, **356**, 444-456.
- Hayashi, H. (1980), Distributions of vibrissae afferent fiber collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, **183**, 442-446.
- Hayashi, H. (1985a), Morphology of central terminations of intra-axonally stained, large, myelinated primary afferent fibers from facial skin in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **237**, 195-215.
- Hayashi, H. (1985b), Morphology of termination of small and large myelinated trigeminal primary afferent fibers in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **240**, 71-89.
- Hayashi, H. and Tabata, T. (1989a), Physiological properties of sensory neurons of the interstitial nucleus in the spinal trigeminal tract, *Exp. Neurol.*, **105**, 219-220.
- Hayashi, H. and Tabata, T. (1989b), Physiological properties of sensory trigeminal neurons projecting to mesencephalic parabrachial area in the cat, *J. Neurophysiol.*, **61**, 1153-1160.
- Hayashi, H. and Tabata, T. (1990), Pulpal and cutaneous inputs to somatosensory neurons in the parabrachial area of the cat, *Brain Res.*, **511**, 177-179.
- Hayashi, H., Sumino, R. and Sessle, B.J. (1984), Functional organization of trigeminal subnucleus interpolaris: nociceptive and innocuous afferent inputs, projections to thalamus, cerebellum, and spinal cord, and descending modulation from periaqueductal gray, *J. Neurophysiol.*, **51**, 890-905.
- Hayes, A.G., Skingle, M. and Tyers, M.B. (1981), Effects of single doses of capsaicin on nociceptive thresholds in the rodent, *Neuropharmacology*, **20**, 505-511.
- He, X., Schepelmann, K., Schaible, H.-G. and Schmidt, R.F. (1990), Capsaicin inhibits responses of fine afferents from the knee joint of the cat to mechanical and chemical stimuli, *Brain Res.*, **530**, 147-150.
- He, Y.F., Ichikawa, H. and Sugimoto, T. (2000), The effect of neonatal capsaicin on the c-Fos-like immunoreactivity induced in subnucleus oralis neurons by noxious intraoral stimulation, *Brain Res.*, **860**, 203-207.
- Hebel, R. and Stromberg, M.W. (1986), Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat, BioMed Verlag, Wörthsee, Federal Republic of Germany.
- Heinricher, M.M. and Kaplan, H.J. (1991), GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat, *Pain*, **47**, 105-113.
- Henry, M.A. and Westrum, L.E. (1990), Central representation of dental structures in the kitten, including projections to the mesencephalic trigeminal nucleus, *Somatosens. Mot. Res.*, **7**, 447-462.
- Henry, M.A., Johnson, L.R., Nousek-Goebel, N. and Westrum, L.E. (1996), Light microscopic localization of calcitonin gene-related peptide in the normal feline trigeminal system and following retrogasserian rhizotomy, *J. Comp. Neurol.*, **365**, 526-540.
- Herdegen, T., Rüdiger, S., Mayer, B., Bravo, R. and Zimmermann, M. (1994), Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **22**, 245-258.
- Hermanson, O. and Blomqvist, A. (1996), Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the parabrachial nucleus after nociceptive stimulation, *J. Comp. Neurol.*, **368**, 45-56.
- Hermanson, O. and Blomqvist, A. (1997), Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the parabrachial nucleus after orofacial nociceptive stimulation of the awake rat, *J. Comp. Neurol.*, **387**, 114-123.
- Hernández, C.J., Ortíz, T., Rosa, C., Foster, K., Tyagi, M., Lugo, N., Albrecht, R. and Chinapen, S. (2007), Substance P and acetylcholine are co-localized in the pathway mediating mucociliary activity in *Rana pipiens*, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 477-481.
- Hirasawa, K. (1925), Concerning laminar structural arrangements in the central nervous system, particularly in the gray substance of the spinal cord, *Kyôto Igakkai Zasshi*, **3**, 428-438.
- Hisanaga, K., Sagar, S.M. and Sharp, F.R. (1992), N-methyl-D-aspartate antagonists block Fos-like protein expression induced via multiple signaling pathways in cultured cortical neurons, *J. Neurochem.*, **58**, 1836-1844.
- Hisanaga, K., Sagar, S.M., Hicks, K.J., Swanson, R.A. and Sharp, F.R. (1990), c-fos proto-oncogene expression in astrocytes

- associated with differentiation or proliferation but not depolarisation, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **8**, 69-75.
- Hockfield, S. and Gobel, S. (1982), An anatomical demonstration of projections to the medullary dorsal horn (trigeminal nucleus caudalis) from rostral trigeminal nuclei and the contralateral caudal medulla, *Brain Res.*, **252**, 203-211.
- Hoffman, D.S., Dubner, R., Hayes, R.L. and Medlin, T.P. (1981), Neuronal activity in medullary dorsal horn of awake monkeys trained in a thermal discrimination task. I. Responses to innocuous and noxious thermal stimuli, *J. Neurophysiol.*, **46**, 409-427.
- Hoffman, G.E., Lee, W.-S., Attardi, B., Yann, V. and Fitzsimmons, M.D. (1990), Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-fos antigen after steroid activation, *Endocrinology*, **126**, 1736-1741.
- Hoffman, G.E., McDonald, T., Shedwick, R. and Nathanielsz, P.W. (1991), Activation of cFos in ovine fetal corticotropin-releasing hormone neurons at the time of parturition, *Endocrinology*, **129**, 3227-3233.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S. and Fitzsimmons, M.D. (1992), Detecting steroidal effects on immediate early gene expression in the hypothalamus, *Neuroprotocols*, **1**, 52-66.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S. and Verbalis, J.G. (1993), c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems, *Front. Neuroendocrinol.*, **14**, 173-213.
- Hoheisel, U. and Mense, S. (1987), Observations on the morphology of axons and somata of slowly conducting dorsal root ganglion cells in the cat, *Brain Res.*, **423**, 269-278.
- Hoheisel, U. and Mense, S. (1989), Long-term changes in discharge behavior of cat dorsal horn neurones following noxious stimulation of deep tissues, *Pain*, **36**, 239-247.
- Hoheisel, U. and Mense, S. (1990), Response behavior of cat dorsal horn neurones receiving input from skeletal muscle and other deep somatic tissues, *J. Physiol.*, **426**, 265-280.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G. and Arimura, A. (1976), Immunohistochemical evidence for separate population of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat, *Neuroscience*, **1**, 131-136.
- Hökfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. and Pernow, B. (1975), Substance P: localisation in the central nervous system and in the primary sensory neurons, *Science*, **190**, 889-890.
- Hole, K. and Tjølsen, A. (1993), The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor, *Pain*, **53**, 247-254.
- Holje, L., Hildebrand, C. and Fried, K. (1983), Proportion of unmyelinated axons in the rat inferior alveolar nerve and mandibular molar pulps after neonatal administration of capsaicin, *Brain Res.*, **266**, 133-136.
- Holland, G.R. and Robinson, P.P. (1983), The number and size of axons at the apex of the cat's canine tooth, *Anat. Rec.*, **205**, 215-222.
- Holland, V.R., Saunders, B.C., Rose, F.L. and Walpole, A.L. (1974), A safer substitute for benzidine in the detection of blood, *Tetraedron*, **30**, 3299-3302.
- Holzer, P. (1988), Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides, *Neuroscience*, **24**, 739-768.
- Holzer, P. (1991), Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons, *Pharmacol. Rev.*, **43**, 143-201.
- Holzer, P. and Jocič, M. (1994), Cutaneous vasodilatation induced by nitric oxide-evoked stimulation of afferent nerves in the rat, *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 1181-1187.
- Honda, C.N., Mense, S. and Perl, E.R. (1983), Neurons in ventrobasal region of cat thalamus selectively responsive to noxious mechanical stimulation, *J. Neurophysiol.*, **49**, 662-673.
- Hong, J.S., Wood, P.L., Gillin, P.L., Yang, H.Y.T. and Costa, E. (1980), Changes of hippocampal Met-enkephalin content after recurrent motor seizures, *Nature*, **285**, 231-232.
- Hong, J.S., Yoshikawa, K., Kanamatsu, T., McGinty, J.F., Mitchell, C.L. and Sabol, S.L. (1985), Repeated electroconvulsive shock alters biosynthesis of enkephalin and concentration of dynorphin in rat brain, *Neuropeptides*, **5**, 557-560.
- Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., Kanje, M. and Edvinsson, L. (2002), Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion, *Neurosci. Lett.*, **330**, 223-226.
- Hu, J.W. (1990), Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (Medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls, *Pain*, **41**, 331-345.

- Hu, J.W. and Sessle, B.J. (1980), Raphe stimulation induces primary afferent depolarization of both low-threshold mechanosensitive and nociceptive trigeminal afferents, *Soc. Neurosci. Abstr.*, **6**, 429.
- Hu, J.W. and Sessle, B.J. (1984), Comparison of responses of cutaneous nociceptive and nonnociceptive brain stem neurons in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and subnucleus oralis to natural and electrical stimulation of tooth pulp, *J. Neurophysiol.*, **52**, 39-53.
- Hu, B., Chiang, C.Y., Hu, J.W., Dostrovsky, J.O. and Sessle, B.J. (2002), P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis, *J. Neurophysiol.*, **88**, 1614-1624.
- Hu, J.W., Dostrovsky, J.O. and Sessle, B.J. (1981), Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I. Responses to oral-facial noxious and non-noxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis, *J. Neurophysiol.*, **45**, 173-192.
- Hu, J.W., Sessle, B.J., Raboisson, P., Dallel, R. and Woda, A. (1992), Stimulation of craniofacial afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brainstem neurones, *Pain*, **48**, 53-60.
- Hua, X., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., Lundberg, J.M. and Hökfelt, T. (1985), Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea pig, *Regul. Pept.*, **13**, 1-19.
- Huang, W., Rothe, M.J. and Grant-Kels, J.M. (1996), The burning mouth syndrome, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **34**, 91-98.
- Huerta, M.F., Frankfurter, A.J. and Harting, J.K. (1981), The trigeminocollicular projection in the cat: patch-like endings within the intermediate gray, *Brain Res.*, **211**, 1-13.
- Hun, H. (1897), Analgesia, thermic anaesthesia, and ataxia resulting from foci of softening in the medulla oblongata and cerebellum due to occlusion of the left inferior posterior cerebellar artery, *N. Y. Med. J.*, **65**, 513-519.
- Hunskar, S. and Hole, K. (1987), The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain*, **30**, 103-114.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B. and Hole, K. (1985), The formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics, *J. Neurosci. Methods*, **14**, 69-76.
- Hunt, S.P., Pini, A. and Evan, G. (1987), Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, **328**, 632-634.
- Hursh, J.B. (1939), Conduction velocity and diameter of nerve fibers, *Am. J. Physiol.*, **127**, 131-139.
- Iadarola, M.J., Douglass, J., Civelli, O. and Naranjo, J.R. (1988), Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization, *Brain Res.*, **455**, 205-212.
- Iadarola, M.J., Shin, C., McNamara, J.O. and Yang, H.Y.T. (1986), Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling, *Brain Res.*, **365**, 185-191.
- Ichikawa, H. and Sugimoto, T. (2000), Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system, *Neuroscience*, **101**, 719-725.
- Ichikawa, H. and Sugimoto, T. (2001), VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion, *Brain Res.*, **890**, 184-188.
- Ichikawa, H. and Sugimoto, T. (2002), The difference of osteocalcin-immunoreactive neurons in the rat dorsal root and trigeminal ganglia: co-expression with nociceptive transducers and central projection, *Brain Res.*, **958**, 459-462.
- Ichikawa, H., Deguchi, T., Nakago, T., Jacobowitz, D.M. and Sugimoto, T. (1995), Parvalbumin- and calretinin-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp, *Brain Res.*, **679**, 205-211.
- Ichikawa, H., Deguchi, T.H., Nakago, T., Jacobowitz, D.M. and Sugimoto, T. (1994), Parvalbumin, calretinin and carbonic anhydrase in the trigeminal and spinal primary neurons of the rat, *Brain Res.*, **655**, 241-245.
- Ichikawa, H., Fukunaga, T., Jin, H.W., Fujita, M., Takano-Yamamoto, T. and Sugimoto, T. (2004), VR1-, VRL-1- and P2X3 receptor-immunoreactive innervation of the rat temporomandibular joint, *Brain Res.*, **1008**, 131-136.
- Ichikawa, H., Jacobowitz, D.M. and Sugimoto, T. (1993), Calretinin-immunoreactive neurons in the trigeminal and dorsal root ganglia of the rat, *Brain Res.*, **617**, 96-102.
- Ichiyama, M., Itoh, M., Miki, T., Xie, Q., Kaneto, T. and Takeuchi, Y. (1997), Central distribution of sensory fibers in the facial nerve: an anatomical and immunohistochemical study, *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, **74**, 53-63.

- Idänpään-Heikkilä, J.J. and Guilbaud, G. (1999), Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour, *Pain*, **79**, 281-290.
- Ikeda, H., Tokita, Y. and Suda, H. (1997), Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp, *J. Dent. Res.*, **76**, 1341-1349.
- Ikeda, M. (1979), Projections from the spinal and the principal sensory nuclei of the trigeminal nerve to the cerebellar cortex in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **184**, 567-585.
- Ikeda, M., Tanami, T. and Matsushita, M. (1984), Ascending and descending internuclear connections of the trigeminal sensory nuclei in the cat: A study with the retrograde and anterograde horseradish peroxidase technique, *Neuroscience*, **12**, 1243-1260.
- Ikegami, S. and Kawamura, H. (1979), Avoidance conditioning to tooth pulp stimulation in the cat after bulbar transection, *Physiol. Behav.*, **23**, 593-596.
- Inoue, H., Asaka, T., Nagata, N. and Koshihara, Y. (1997), Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, **333**, 231-240.
- Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K. and Denda, M. (2002), Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 124-129.
- Iritani, S., Fujii, M. and Satoh, K. (1989), The distribution of substance P in the cerebral cortex and hippocampal formation: An immunohistochemical study in the monkey and rat, *Brain Res. Bull.*, **22**, 295-303.
- Ishidori, H., Nishimori, T., Shigenaga, Y., Suemune, S., Dateoka, Y., Sera, M. and Nagasaka, N. (1986), Representation of upper and lower primary teeth in the trigeminal sensory nuclear complex in the young dog, *Brain Res.*, **370**, 153-158.
- Itoh, Y. and Tessler, A. (1990), Ultrastructural organization of regenerated adult dorsal root axons within transplants of fetal spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **292**, 396-411.
- Iwata, K., Takahashi, O., Tsuboi, Y., Ochiai, H., Hibiya, J., Sakaki, T., Yamaguchi, Y. and Sumino, R. (1998), Fos protein induction in the medullary dorsal horn and first segment of the spinal cord by tooth-pulp stimulation in cats, *Pain*, **75**, 27-36.
- Jacobson, L., Sharp, F.R. and Dallman, M.F. (1990), Induction of *fos*-like immunoreactivity in hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons after adrenalectomy in the rat, *Endocrinology*, **126**, 1709-1719.
- Jacquin, M.F. and Rhoades, R.W. (1983), Central projections of the normal and "regenerate" infraorbital nerve in adult rats subjected to neonatal unilateral infraorbital lesions: a transganglionic horseradish peroxidase study, *Brain Res.*, **269**, 137-144.
- Jacquin, M.F. and Rhoades, R.W. (1985), Effects of neonatal infraorbital lesions upon central trigeminal primary afferent projections in rat and hamster, *J. Comp. Neurol.*, **235**, 129-143.
- Jacquin, M.F. and Rhoades, R.W. (1990), Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis, *Somatosens. Mot. Res.*, **7**, 265-288.
- Jacquin, M.F., Barcia, M. and Rhoades, R.W. (1989), Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris: IV. Projection neurons, *J. Comp. Neurol.*, **282**, 45-62.
- Jacquin, M.F., Chiaia, N.L. and Rhoades, R.W. (1990), Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity, *Somatosens. Mot. Res.*, **7**, 153-183.
- Jacquin, M.F., Golden, J. and Panneton, W.M. (1988b), Structure and function of barrel "precursor" cells in trigeminal nucleus principalis, *Dev. Brain Res.*, **32**, 309-314.
- Jacquin, M.F., Renehan, W.E., Mooney, R.D. and Rhoades, R.W. (1986a), Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. I. Trigeminal primary afferents, *J. Neurophysiol.*, **55**, 1153-1186.
- Jacquin, M.F., Semba, K., Egger, M.D. and Rhoades, R.W. (1983), Organization of HRP-labeled trigeminal mandibular primary afferent neurons in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **215**, 397-420.
- Jacquin, M.F., Semba, K., Rhoades, R.W. and Egger, M.D. (1982), Trigeminal primary afferents project bilaterally to dorsal horn and ipsilaterally to cerebellum, reticular formation, and cuneate, solitary, supratrigeminal and vagal nuclei, *Brain Res.*, **246**, 285-291.
- Jacquin, M.F., Stennett, R.A., Renehan, W.E. and Rhoades, R.W. (1988a), Structure function relationships in the rat brainstem subnucleus interpolaris. II. Low and high threshold trigeminal primary afferents, *J. Comp. Neurol.*, **267**, 107-130.
- Jacquin, M.F., Woerner, D., Szczepanik, A.M., Riecker, V., Mooney, R.D. and Rhoades, R.W. (1986b), Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus

- interpolaris. I. Vibrissa primary afferents, *J. Comp. Neurol.*, **243**, 266-279.
- Jancsó, G. and Király, E. (1980), Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the central nervous system of the rat, *J. Comp. Neurol.*, **190**, 781-792.
- Jancsó, G. and Lawson, S.N. (1990), Transganglionic degeneration of capsaicin-sensitive C-fiber primary afferent terminals, *Neuroscience*, **39**, 501-511.
- Jancsó, G., Király, E. and Jancsó-Gábor, A. (1977), Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones, *Nature*, **270**, 741-743.
- Jancsó, G., Király, E. and Jancsó-Gábor, A. (1980), Chemosensitive pain fibres and inflammation, *Int. J. Tissue React.*, **2**, 57-66.
- Jancsó, G., Király, E., Joó, F., Such, G. and Nagy, A. (1985), Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat, *Neurosci. Lett.*, **59**, 209-214.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. and Szolcsányi, J. (1967), Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **31**, 138-151.
- Jasmin, L., Gogas, K.R., Ahlgren, S.C., Levine, J.D. and Basbaum, A.I. (1994), Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat, *Neuroscience*, **58**, 275-286.
- Jensen, T. and Norup, M. (1996), Experimental pain in human temporal muscle induced by hypertonic saline, potassium and acidity, *Cephalalgia*, **12**, 101-106.
- Jessell, T.M., Iversen, L.L. and Cuello, A.C. (1978), Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones, *Brain Res.*, **152**, 183-188.
- Johnsen, D.C. and Johns, S. (1978), Quantitation of nerve fibres in the primary and permanent canine and incisor teeth in man, *Arch. Oral Biol.*, **23**, 825-829.
- Johnsen, D.C., Harshbarger, J. and Rymer, H.D. (1983), Quantitative assessment of neuronal development in human premolars, *Anat. Rec.*, **205**, 421-429.
- Jones, E.G. and Leavitt, R.Y. (1974), Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey, *J. Comp. Neurol.*, **154**, 349-377.
- Jones, M.W., Apkarian, A.V., Stevens, R.T. and Hodge, C.J. Jr. (1987), The spinothalamic tract: An examination of cells of origin of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways in cats, *J. Comp. Neurol.*, **260**, 349-361.
- Joó, F., Szolcsányi, J. and Jancsó-Gábor, A. (1969), Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin, *Life Sci.*, **8**, 621-626.
- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D. and Julius, D. (2004), Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature*, **427**, 260-265.
- Jørgensen, M.B., Deckert, J., Wright, D.C. and Gehlert, D.R. (1989), Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study, *Brain Res.*, **484**, 393-398.
- Jourdan, D., Ardid, D., Bardin, L., Bardin, M., Neuzeret, D., Lanphouthacoul, L. and Eschalier, A. (1997), A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats, *Pain*, **71**, 265-270.
- Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J.A., Frey, P., Elde, R.P. and Brown, J.C. (1987), Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells, *Cell Tissue Res.*, **247**, 417-431.
- Kaczmarek, L., Siedlecki, J.A. and Danysz, W. (1988), Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus, *Brain Res.*, **427**, 183-186.
- Kalia, M. and Welles, R.V. (1980), Brain stem projections of the aortic nerve in the cat: a study using tetramethyl benzidine as the substrate for horseradish peroxidase, *Brain Res.*, **188**, 23-32.
- Kaneko, M. and Hammond, D.L. (1997), Role of spinal γ -aminobutyric acid_A receptors in formalin-induced nociception in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 928-938.
- Kappers, C.U.A., Huber, C.G., Crosby, E.C. (1936), *The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates including Man*, New York, TI Hafner.
- Karamanlidis, A.N. (1968), Trigemino-cerebellar fiber connections in the goat studied by means of the retrograde cell degeneration method, *J. Comp. Neurol.*, **133**, 71-88.

- Kato, J., Wakisaka, S., Tabata, M.J., Sasaki, Y. and Kurisu, K. (1994), Induction of Fos protein in the rat trigeminal nucleus complex during an experimental tooth movement, *Arch. Oral Biol.*, **39**, 723-726.
- Kawata, M., Hirakawa, M., Kumamoto, K., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. and Sano, Y. (1989), Brain natriuretic peptide in the porcine spinal cord: an immunohistochemical investigation of its localization and the comparison with atrial natriuretic peptide, substance P, calcitonin gene-related peptide and enkephalin, *Neuroscience*, **33**, 401-410.
- Keefe, D.A. (1978), Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported detailed dendritic marker, *Brain Res.*, **140**, 15-32.
- Keller, O., Buthkhusi, S.M., Vyklicky, L. and Brozek, G. (1974), Cortical responses evoked by stimulation of tooth pulp afferents in the cat, *Physiol. Bohemoslov.*, **23**, 45-53.
- Kenins, P. (1982), Responses of single nerve fibres to capsaicin applied to the skin, *Neurosci. Lett.*, **29**, 83-88.
- Kerr, F.W.L. (1961), Structural relation of the trigeminal spinal tract to upper cervical roots and the solitary nucleus in the cat, *Exp. Neurol.*, **4**, 134-148.
- Kerr, F.W.L. (1962), Facial, vagal and glossopharyngeal nerves in the cat, *Arch. Neurol.*, **6**, 264-281.
- Kerr, F.W.L. (1963), The divisional organization of afferent fibres of the trigeminal nerve, *Brain*, **86**, 721-732.
- Kerr, F.W.L. (1972), The potential of cervical primary afferents to sprout in the spinal nucleus of V following long term trigeminal denervation, *Brain Res.*, **43**, 547-560.
- Kerr, F.W.L. and Lysak, W.R. (1964), Somatotopic organization of trigeminal ganglion neurones, *Arch. Neurol.*, **11**, 593-602.
- Kerr, F.W.L., Kruger, L., Schwassmann, H.O. and Stern, R. (1968), Somatotopic organization of mechanoreceptor units in the trigeminal nuclear complex of the macaque, *J. Comp. Neurol.*, **134**, 127-144.
- Khayyat, G.F., Yu, Y.J. and King, R.B. (1975), Response patterns to noxious and non-noxious stimuli in rostral trigeminal relay nuclei, *Brain Res.*, **97**, 47-60.
- Killackey, H.P. and Erzurumlu, R.S. (1981), Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat, *J. Comp. Neurol.*, **201**, 221-242.
- King, J.C., Lechan, R.M., Kugen, G. and Anthony, E.L.P. (1983), Acrolein: a fixative for immunocytochemical localization of peptides in the central nervous system, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 62-68.
- Knyihár, E. and Csillik, B. (1977), Regional distribution of acid phosphatase positive axonal systems in the rat spinal cord and medulla representing central terminals of cutaneous and visceral nociceptive neurons, *J. Neural Transm.*, **40**, 227-234.
- Knyihár-Csillik, E., Török, A. and Csillik, B. (1990), Primary afferent origin of substance P-containing axons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord: depletion, regeneration and replenishment of presumed nociceptive central terminals, *J. Comp. Neurol.*, **297**, 594-612.
- Kobayashi, Y. and Matsumura, G. (1996), Central projections of primary afferent fibers from the rat trigeminal nerve labeled with isolectin B4-HRP, *Neurosci. Lett.*, **217**, 89-92.
- Kojima, Y. (1990), Convergence patterns of afferent information from the temporomandibular joint and masseter muscle in the trigeminal subnucleus caudalis, *Brain Res. Bull.*, **24**, 609-616.
- Kolesnikov, Y., Cristea, M., Oksman, G., Torosjan, A. and Wilson, R. (2004), Evaluation of the tail formalin test in mice as a new model to assess local analgesic effects, *Brain Res.*, **1029**, 217-223.
- Koltzenburg, M., Lundberg, L.E. and Torebjörk, H.E. (1992), Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin, *Pain*, **51**, 207-219.
- Konietzny, F. and Hensel, H. (1983), The effect of capsaicin on the response characteristics of human C-polymodal nociceptors, *J. Therm. Biol.*, **8**, 213-215.
- Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988), The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction, *Nature*, **336**, 646-651.
- Kress, M., Fetzer, S., Reeh, P.W. and Vyklicky, L. (1996), Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat, *Neurosci. Lett.*, **211**, 5-8.
- Kristensson, K. and Olsson, Y. (1971), Retrograde axonal transport of protein, *Brain Res.*, **29**, 363-365.
- Kristensson, K., Olsson, Y. and Sjöstrand, J. (1971), Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve, *Brain Res.*, **32**, 399-406.
- Kruger, L. and Michel, F. (1962a), A morphological and somatotopic analysis of single unit activity in the trigeminal sensory complex of the cat, *Exp. Neurol.*, **5**, 139-156.
- Kruger, L. and Michel, F. (1962b), Reinterpretation of the representation of

- pain based on physiological excitation of single neurons in the trigeminal sensory complex, *Exp. Neurol.*, **5**, 157-178.
- Kruger, L., Mantyh, P.W., Sternini, C., Brecha, N.C. and Mantyh, C.R. (1988a), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat central nervous system: Patterns of immunoreactivity and receptor binding sites, *Brain Res.*, **463**, 223-244.
- Kruger, L., Sminoff, R. and Witkovsky, P. (1961), Single neuron analysis of dorsal column nuclei and spinal nucleus of trigeminal in cat, *J. Neurophysiol.*, **24**, 333-349.
- Kruger, L., Sternini, C., Brecha, N.C. and Mantyh, P.W. (1988b), Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in relation to the rat central somatosensory projection, *J. Comp. Neurol.*, **273**, 149-162.
- Kruijer, W., Schubert, D. and Verma, I.M. (1985), Induction of the proto-oncogene *fos* by nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7330-7334.
- Kuenzi, F.M. and Dale, N. (1996), Effect of capsaicin and analogues on potassium and calcium currents in *Xenopus* embryo spinal neurones, *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 81-90.
- Kuhlenbeck, H. (1975), The Central Nervous System of Vertebrates, Vol. 4: Spinal Cord and Deuterencephalon, Karger, Basel, pp. 1006.
- Kumazawa, T. and Mizumura, M. (1977), Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog, *J. Physiol.*, **273**, 179-194.
- Kumazawa, T. and Mizumura, M. (1980), Mechanical and thermal responses of polymodal receptors recorded from the superior spermatic nerve of dogs, *J. Physiol.*, **299**, 233-245.
- Kunc, Z., Significant factors pertaining to the result of trigeminal tractotomy. In: Hassler, R. and Walker, E. (eds.): Trigeminal neuralgia, Georg Thieme, Stuttgart, 1970, pp. 90-100.
- Kuwayama, Y. and Stone, R.A. (1986), Cholecystinin-like immunoreactivity occurs in ocular sensory neurons and partially co-localizes with substance P, *Brain Res.*, **381**, 266-274.
- Kuwayama, Y., Terenghi, G., Polak, J.M., Trojanowski, J.Q. and Stone, R.A. (1987), A quantitative correlation of substance P-, calcitonin gene-related peptide- and cholecystinin-like immunoreactivity with retrogradely labeled trigeminal ganglion cells innervating the eye, *Brain Res.*, **405**, 220-226.
- LaMotte, R.H. and Campbell, J.N. (1978), Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain, *J. Neurophysiol.*, **41**, 509-528.
- Landgren, S., Olsson, K.Å. and Westberg, K.G. (1986), Bulbar neurones with axonal projections to the trigeminal motor nucleus in the cat, *Exp. Brain Res.*, **65**, 98-111.
- Landschulz, W.M., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1989), The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite, *Science*, **243**, 1681-1688.
- Landschulz, W.M., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. and McKnight, S.L. (1988), The leucine-zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins, *Science*, **240**, 1759-1764.
- Lara, J.P., Parkes, M.J., Silva-Carvalho, L., Izzo, P., Dawid-Milner, M.S. and Spyer, K.M. (1994), Cardiovascular and respiratory effects of stimulation of cell bodies of the parabrachial nuclei in the anesthetized rat, *J. Physiol.*, **477**, 321-329.
- Larson, M. and Stein, B.E. (1984), The use of tactile and olfactory cues in neonatal orientation and localization of the nipple, *Dev. Psychobiol.*, **17**, 423-436.
- Lau, L.F. and Nathans, D. (1987), Expression of a set of growth-related immediate-early genes in BALB/C 3T3 cells: coordinate regulation with *c-fos* or *c-myc*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1182-1186.
- LaVail, J.H., A review of the retrograde transport technique. In: Robertson, R.T. (ed.), Methods in Physiological Psychology, Vol. II, Neuroanatomical Research Techniques, New York, Academic Press, 1978, pp. 355-384.
- LaVail, J.H. and LaVail, M.M. (1972), Retrograde axonal transport in the central nervous system, *Science*, **176**, 1416-1417.
- LaVail, J.H. and LaVail, M.M. (1974), The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system. A light and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, **157**, 303-357.
- LaVail, J.H., Winston, K.R. and Tish, A. (1973), A method based on retrograde intraaxonal transport of protein for identification of cell bodies of origin of axons terminating within the CNS, *Brain Res.*, **58**, 470-477.
- Lawson, S.N., Harper, A.A., Harper, E.I., Garson, J.A. and Anderton, B.H. (1984), A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation

- of rat sensory neurons, *J. Comp. Neurol.*, **228**, 263-272.
- Le Gal La Salle, G. (1988), Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus, *Neurosci. Lett.*, **88**, 127-130.
- Lee, K.J., Chung, K., Chung, J.M. and Coggeshall, R.E. (1986), Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **243**, 335-346.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. and Tjian, R. (1987), Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40., *Nature*, **325**, 368-372.
- Lee, Y., Kawai, Y., Shiosaka, S., Takami, K., Kiyama, H., Hillyard, C.J., Girgis, S., MacIntyre, I., Emson, P.C. and Tohyama, M. (1985), Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis, *Brain Res.*, **330**, 194-196.
- LeGreves, P., Nyberg, F., Terenius, L. and Hökfelt, T. (1985), Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation, *Eur. J. Pharmacol.*, **115**, 309-311.
- Lehtosalo, J.I., Uusitalo, H., Stjernschantz, J. and Palkama, A. (1984), Substance P-like immunoreactivity in the trigeminal ganglion. A fluorescence, light and electron microscope study, *Histochemistry*, **80**, 421-427.
- Lembeck, F. and Holzer, P. (1979), Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **310**, 175-183.
- Lembeck, F., Donnerer, J., Tsuchiya, M. and Nagahisa, A. (1992), The non-peptide tachykinin antagonist, CP-96,345, is a potent inhibitor of neurogenic inflammation, *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 527-530.
- Li, J.L., Kaneko, T., Shigemoto, R. and Mizuno, N. (1997), Distribution of trigeminohypothalamic and spinohypothalamic tract neurons displaying substance P receptor-like immunoreactivity in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **378**, 508-521.
- Li, Y.Q., Takada, M., Kaneko, T. and Mizuno, N. (1995), Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: differential distribution in the lower brainstem of the rat, *J. Comp. Neurol.*, **356**, 563-579.
- Liang, Y.F. and Terashima, S.I. (1993), Physiological properties and morphological characteristics of cutaneous and mucosal mechanical nociceptive neurons with A- δ peripheral axons in the trigeminal ganglia of crotaline snakes, *J. Comp. Neurol.*, **328**, 88-102.
- Lieberman, A.R., Sensory ganglia. In: Landon, D.N. (ed.), *The peripheral nerve*, London, Chapman & Hall, 1976, pp. 188-278.
- Light, A.R. (1992), The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems, Basel, S. Karger.
- Light, A.R. and Perl, E.R. (1979a), Reexamination of dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers, *J. Comp. Neurol.*, **186**, 117-131.
- Light, A.R. and Perl, E.R. (1979b), Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers, *J. Comp. Neurol.*, **186**, 133-150.
- Light, A.R., Trevino, D.L. and Perl, E.R. (1979), Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn, *J. Comp. Neurol.*, **186**, 151-171.
- Lima, D. (1990), A spinomedullary projection terminating in the dorsal reticular nucleus of the rat, *Neuroscience*, **34**, 577-589.
- Lima, D. and Coimbra, A. (1983), The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells, *Anat. Embryol. (Berl.)*, **167**, 273-288.
- Lima, D. and Coimbra, A. (1986), A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **244**, 53-71.
- Lima, D. and Coimbra, A. (1990), Structural types of marginal (lamina I) neurons projecting to the dorsal reticular nucleus of the medulla oblongata, *Neuroscience*, **34**, 591-606.
- Lippe, I.T., Stabentheiner, A. and Holzer, P. (1993), Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin, *Eur. J. Pharmacol.*, **232**, 113-120.
- Lisney, S.J.W. (1978), Some anatomical and electrophysiological properties of tooth-pulp afferents in the cat, *J. Physiol.*, **284**, 19-36.
- Liu, D. and Hu, Y. (1988), The central projections of the great auricular nerve primary afferent fibers - an HRP

- transganglionic tracing method, *Brain Res.*, **445**, 205-210.
- Liu, L., Welch, J.M., Erickson, R.P., Reinhart, P.H. and Simon, S.A. (2000), Different responses to repeated applications of zingerone in behavioral studies, recordings from intact and cultured TG neurons, and from VR1 receptors, *Physiol. Behav.*, **69**, 177-186.
- Lloyd, D.P.C. (1943), Neurons patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat, *J. Neurophysiol.*, **6**, 293-315.
- Lloyd, K.G., Pichat, P., Scatton, B., Zivkovic, B., Morselli, P.L. and Bartholini, G. (1990), The psychopharmacology of GABA synapses: update 1989, *J. Neural. Transm. Suppl.*, **29**, 13-28.
- Louis, S.M., Jamieson, A., Russell, N.J. and Dockray, G.J. (1989), The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat, *Neuroscience*, **32**, 581-586.
- Lu, J., Hathaway, C.B. and Bereiter, D.A. (1993), Adrenalectomy enhances Fos-like immunoreactivity within the spinal trigeminal nucleus induced by noxious thermal stimulation of the cornea, *Neuroscience*, **54**, 809-818.
- Luccarini, P., Perrier, L., Dégoulange, C., Gaydier, A.-M. and Dallel, R. (2004), Synergistic antinociceptive effect of amitriptyline and morphine in the rat orofacial formalin test, *Anesthesiology*, **100**, 690-696.
- Luccarini, Ph., Cadet, R., Duale, C. and Woda, A. (1998), Effects of lesions in the trigeminal oralis and caudalis subnuclei on different orofacial nociceptive responses in the rat, *Brain Res.*, **803**, 79-85.
- Lucier, G.E. and Egizii, R. (1989), Characterization of cat nasal afferents and brain stem neurones receiving ethmoidal input, *Exp. Neurol.*, **103**, 83-89.
- Lundberg, J.M. and Saria, A. (1987), Polypeptide-containing neurons in airway smooth muscle, *Annu. Rev. Physiol.*, **49**, 557-572.
- Lundberg, J.M., Brodin, E., Hua, X.-Y. and Saria, A. (1984), Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig, *Acta Physiol. Scand.*, **120**, 217-227.
- Luo, C.L., Li, H.-L. and Li, J.-S. (1998), Spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord of anesthetized rat induced by subcutaneous bee venom injection, *Brain Res.*, **806**, 175-185.
- Lynch, G., Gall, C., Mensah, P. and Cotman, C.W. (1974), Horseradish peroxidase histochemistry: a new method for tracing efferent projections in the central nervous system, *Brain Res.*, **65**, 373-380.
- Lynn, B. and Shakhaneh, J. (1988), Substance P content of the skin, neurogenic inflammation and numbers of C-fibres following capsaicin application to a cutaneous nerve in the rabbit, *Neuroscience*, **24**, 769-775.
- Ma, W.L., Zhang, W.B., Xiong, K.H. and Guo, F. (2007), Visceral and orofacial somatic afferent fiber terminals converge onto the same neuron in paratrigeminal nucleus: An electron microscopic study in rats, *Auton. Neurosci.*, **131**, 45-49.
- Mai, J.K., Stephens, P.H., Hopf, A. and Cuello, A.C. (1986), Substance P in the human brain, *Neuroscience*, **17**, 709-739.
- Maixner, W., Dubner, R., Bushnell, M.C., Kenshalo, D.R. and Oliveras, J.L. (1986), Wide-dynamic-range dorsal horn neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious heat stimuli, *Brain Res.*, **374**, 385-388.
- Maixner, W., Dubner, R., Kenshalo, D.R., Bushnell, M.C. and Oliveras, J.L. (1989), Responses of monkey medullary dorsal horn neurons during the detection of noxious heat stimuli, *J. Neurophysiol.*, **62**, 437-449.
- Malmgren, L. and Olsson, Y. (1978), A sensitive method for histochemical demonstration of horseradish peroxidase in neurons following retrograde axonal transport, *Brain Res.*, **148**, 279-294.
- Marfurt, C.F. (1981), The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **203**, 785-798.
- Marfurt, C.F. and Del Toro, D.R. (1987), Corneal sensory pathway in the rat: a horseradish peroxidase tracing study, *J. Comp. Neurol.*, **261**, 450-459.
- Marfurt, C.F. and Rajchert, D.M. (1991), Trigeminal primary afferent projections to "non-trigeminal" areas of the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, **303**, 489-511.
- Marfurt, C.F. and Turner, D.F. (1984), The central projections of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **223**, 535-547.
- Marfurt, C.F., Ellis, L.C. and Jones, M.A. (1993), Sensory and sympathetic nerve

- sprouting in the rat cornea following neonatal administration of capsaicin, *Somatosens. Mot. Res.*, **10**, 377-398.
- Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y. and Basbaum, A.I. (1999), Immunohistochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, **405**, 299-321.
- Marlier, L., Rajaofetra, N., Poulat, P. and Privat, A. (1990), Modification of serotonergic innervation of the rat spinal cord dorsal horn after neonatal capsaicin treatment, *J. Neurosci. Res.*, **25**, 112-118.
- Marsh, S.J., Stansfeld, C.E., Brown, D.A., Davey, R. and McCarthy, D. (1987), The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons *in vitro*, *Neuroscience*, **23**, 275-290.
- Mason, R.J. and Maruniak, J.A. (1983), Behavioral and physiological effects of capsaicin in red-winged blackbirds, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **19**, 857-862.
- Mason, R.T., Peterfreund, R.A., Sawchenko, P.E., Corrigan, A.Z., Rivier, J.E. and Vale, W.W. (1984), Release of the predicted calcitonin gene-related peptide from cultured rat trigeminal ganglion cells, *Nature*, **308**, 653-655.
- Matesz, C. (1983), Termination areas of primary afferent fibers of the trigeminal nerve in the rat, *Acta Biol. Hungarica*, **34**, 31-43.
- Matsushita, M. and Tanami, T. (1983), Contralateral termination of primary afferent axons in the sacral and caudal segments of the cat, as studied by anterograde transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **220**, 206-218.
- Matsushita, M., Ikeda, M. and Okado, N. (1982), The cells of origin of the trigeminothalamic, trigeminospinal and trigeminocerebellar projections in the cat, *Neuroscience*, **7**, 1439-1454.
- Matthews, B., Baxter, J. and Watts, S. (1976), Sensory and reflex responses to tooth pulp stimulation in man, *Brain Res.*, **113**, 83-94.
- Matthews, P.B.C. (1963), The response of de-efferented muscle spindle receptors to stretching at different velocities, *J. Physiol. (Lond.)*, **168**, 660-678.
- Maxwell, D.J. (1985), Combined light and electron microscopy of Golgi-labelled neurons in lamina III of the feline spinal cord, *J. Anat.*, **141**, 155-169.
- Maxwell, D.J., Fyffe, R.E.W. and Réthelyi, M. (1983), Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurons in the cat spinal cord, *Neuroscience*, **10**, 1-22.
- Mayer, D.J., Price, D.D. and Becker, D.P. (1975), Neurophysiological characterization of the anterolateral spinal cord neurons contributing to pain perception in man, *Pain*, **1**, 51-58.
- McCall, W.D., Tanner, K.D. and Levine, J.D. (1996), Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat, *Neurosci. Lett.*, **208**, 45-48.
- McDonald, D.M., Bowden, J.J., Baluk, P. and Bunnett, N.W. (1996), Neurogenic inflammation: a model for studying efferent actions of sensory nerves, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **410**, 453-462.
- McHaffie, J.G., Ogasawara, K. and Stein, B.E. (1986), Trigeminothalamic and other trigeminofugal projections in neonatal kittens: An anatomical demonstration with horseradish peroxidase and tritiated leucine, *J. Comp. Neurol.*, **249**, 411-427.
- McIlhinney, R.A.J., Bacon, S.J. and Smith, A.D. (1988), A simple and rapid method for the production of cholera B-chain coupled to horseradish peroxidase for neuronal tracing, *J. Neurosci. Meth.*, **22**, 189-194.
- McKenzie, K.G. (1955), Trigeminal tractotomy, *Clin. Neurosurg.*, **2**, 50-69.
- Meddings, J.B., Hogaboam, C.M., Tran, K., Reynolds, J.D. and Wallace, J.L. (1991), Capsaicin effects on non-neuronal plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 43-50.
- Meller, S.T. (1994), Thermal and mechanical hyperalgesia: a distinctive role for different excitatory amino acid receptors and signal transduction pathways?, *Journal of the American Pain Society*, **3**, 215-231.
- Menetrey, D., Gannon, A., Levine, J.D. and Basbaum, A.I. (1989), Expression of *c-fos* protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation, *J. Comp. Neurol.*, **285**, 177-195.
- Meng, I.D. and Bereiter, D.A. (1996), Differential distribution of Fos-like immunoreactivity in the spinal trigeminal nucleus after noxious and innocuous thermal and chemical stimulation of rat cornea, *Neuroscience*, **72**, 243-254.
- Mense, S. (1977), Nervous outflow from skeletal muscle following chemical noxious stimulation, *J. Physiol. (Lond.)*, **267**, 75-88.
- Mense, S. (1990), Structure-function relationships in identified afferent neurons, *Anat. Embryol.*, **181**, 1-17.
- Merighi, A., Kar, S., Gibson, S.J., Ghidella, S., Gobetto, A., Peirone, S.M. and Polak, J.M. (1990), The immunocytochemical distribution of seven peptides in the spinal

- cord and dorsal root ganglia of horse and pig, *Anat. Embryol.*, **181**, 271-280.
- Merkshy, H. (1979), Pain terms: a list with definition and notes on usage, *Pain*, **6**, 249-252.
- Mesulam, M.M. (1976), The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: incubation parameters and visibility, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 1273-1280.
- Mesulam, M.M. (1978), Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 106-117.
- Mesulam, M.M., Enzyme histochemistry of horseradish peroxidase for tracing neural connections with the light microscope. In: Johnson, J.E.Jr. (ed.), *Current Trends in Morphological Techniques*, CRC (Florida), Vol. 1, 1981, pp. 1-54.
- Mesulam, M.M., Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways-axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In: Mesulam, M.M. (ed.), *Tracing Neural Connections with horseradish peroxidase*, Chichester, Wiley, 1982, pp. 1-151.
- Mesulam, M.M. and Rosene, D.L. (1977), Differential sensitivity between blue and brown reaction procedures for HRP neurohistochemistry, *Neurosci. Lett.*, **5**, 7-14.
- Micevych, P.E. and Kruger, L. (1992), The status of calcitonin gene-related peptide as an effector peptide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **657**, 379-396.
- Milbrandt, J. (1986), Nerve growth factor rapidly induces c-fos mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4789-4793.
- Mineta, Y., Eisenberg, E. and Strassman, A.M. (1995), Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal medullary reticular formation following noxious facial stimulation in the rat, *Exp. Brain Res.*, **107**, 34-38.
- Miyoshi, Y., Suemune, S., Yoshida, A., Takemura, M., Nagase, Y. and Shigenaga, Y. (1994), Central terminations of low-threshold mechanoreceptive afferents in the trigeminal nuclei interpolaris and caudalis of the cat, *J. Comp. Neurol.*, **340**, 207-232.
- Mizuno, N. and Nomura, S. (1986), Primary afferent fibers in the glossopharyngeal nerve terminate in the dorsal division of the principal sensory trigeminal nucleus: An HRP study in the cat, *Neurosci. Lett.*, **66**, 338-340.
- Mizuno, N., Yasui, Y., Nomura, S., Itoh, K., Konishi, A., Takada, M. and Kudo, M. (1983), A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus, *J. Comp. Neurol.*, **215**, 290-298.
- Molander, C. and Grant, G. (1984), The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord, *J. Comp. Neurol.*, **230**, 133-141.
- Molander, C., Xu, Q., Rivero-Melian, C. and Grant, G. (1989), Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. II. The cervical and upper thoracic cord, *J. Comp. Neurol.*, **289**, 375-385.
- Morgan, J.I. (1991), *Proto-oncogene expression in the nervous system*, Amsterdam, Elsevier.
- Morgan, J.I. and Curran, T. (1986), Role of ion flux in the control of c-fos expression, *Nature*, **322**, 552-555.
- Morgan, J.I. and Curran, T. (1988), Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons, *Cell Calcium*, **9**, 303-311.
- Morgan, J.I. and Curran, T. (1989), Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes, *TINS*, **12**, 459-462.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L. and Curran, T. (1987), Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure, *Science*, **237**, 192-197.
- Morgenlander, J.C., Hurwitz, B.J. and Marsey, E.W. (1990), Capsaicin for the treatment of pain in the Guillain-Barré syndrome, *Ann. Neurol.*, **28**, 199.
- Mori, H., Ishida-Yamamoto, A., Senba, E., Ueda, Y. and Tohyama, M. (1990), Calcitonin gene-related peptide containing sensory neurons innervating tooth pulp and buccal mucosa of the rat: an immunohistochemical analysis, *J. Chem. Neuroanat.*, **3**, 155-163.
- Mosso, J.A. and Kruger, L. (1973), Receptor categories represented in spinal trigeminal nucleus caudalis, *J. Neurophysiol.*, **36**, 472-488.
- Mraovitch, S., Kumada, M. and Reis, D.J. (1982), Role of the nucleus parabrachialis in cardiovascular regulation in cat, *Brain Res.*, **232**, 57-75.
- Murray, C.W., Porreca, F. and Cowan, A. (1988), Methodological refinements to the mouse paw formalin test, an animal model of tonic pain, *J. Pharmacol. Methods*, **20**, 175-186.

- Nagata, T. and Kruger, L. (1979), Tactile neurons of the superior colliculus of the cat: Input and physiological properties, *Brain Res.*, **174**, 19-37.
- Nagy, J.I. and Hunt, S.P. (1982), Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurons in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin, *Neuroscience*, **7**, 89-97.
- Nagy, J.I. and Hunt, S.P. (1983), The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: evidence for rearrangement following capsaicin treatment, *J. Comp. Neurol.*, **218**, 145-158.
- Nagy, J.I., Hunt, S.P., Iversen, L.L. and Emson, P.C. (1981), Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin, *Neuroscience*, **6**, 1923-1934.
- Nagy, J.I., Iversen, L.L., Goedert, M., Chapman, D. and Hunt, S.P. (1983), Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat, *J. Neurosci.*, **3**, 399-406.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. and Nathans, D. (1988), DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by fos, *Cell*, **55**, 907-915.
- Nakane, P.K. and Kawaoi, A. (1974), Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084-1091.
- Nasution, I.D. and Shigenaga, Y. (1987), Ascending and descending internuclear projections within the trigeminal sensory nuclear complex, *Brain Res.*, **425**, 234-247.
- Nelson, E.K. (1919), The constitution of capsaicin-the pungent principle of capsicum, *J. Am. Chem. Soc.*, **41**, 1115-1117.
- Nishikawa, N. and Yokota, T. (1985), The morphology of trigeminal nociceptive neurons in the caudal bulbar lateral reticular formation of the cat, *Brain Res.*, **347**, 166-168.
- Nishimori, T., Sera, M., Suemune, S., Yoshida, A., Tsuru, K., Tsuiki, Y., Akisaka, T., Okamoto, T., Dateoka, Y. and Shigenaga, Y. (1986), The distribution of muscle primary afferents from the masseter nerve to the trigeminal sensory nuclei, *Brain Res.*, **372**, 375-381.
- Nishimori, T., Buzzi, M.G., Chudler, E.H., Poletti, C.E., Moskowitz, M.A. and Uhl, G.R. (1990), Preproenkephalin upregulation in nucleus caudalis: high and low intensity afferent stimulation differentially modulate early and late responses, *J. Comp. Neurol.*, **302**, 1002-1018.
- Noback, C.R. and Harting, J.K. (1971), Spinal cord (spinal medulla). In: Hofer *et al.* (eds.), *Primatologia*, Vol. II, Teil 2, Lieferung 2, Karger, Basel.
- Noguchi, K., Morita, Y., Kiyama, H., Sato, M., Ono, K. and Tohyama, M. (1989), Preproenkephalin gene expression in the rat spinal cord after noxious stimuli, *Molec. Brain Res.*, **5**, 227-234.
- Nomura, S. and Mizuno, N. (1981), Central distribution of afferent and efferent components of the chordi tympani in the cat as revealed by the horseradish peroxidase method, *Brain Res.*, **214**, 229-237.
- Nomura, S. and Mizuno, N. (1983a), Central distribution of afferent fibers in the intermediate nerve: A transganglionic HRP study in the cat, *Neurosci. Lett.*, **41**, 227-231.
- Nomura, S. and Mizuno, N. (1983b), Central distribution of efferent and afferent components of the cervical branches of the vagus nerve, *Anat. Embryol. (Berl.)*, **166**, 1-16.
- Nomura, S. and Mizuno, N. (1984), Central distribution of primary afferent fibers in the Arnold's nerve (the auricular branch of the vagus nerve): A transganglionic HRP study in the cat, *Brain Res.*, **292**, 199-205.
- Nomura, S., Itoh, K., Sugimoto, T., Yasui, Y., Kamiya, H. and Mizuno, N. (1986), Mystacial vibrissae representation within the trigeminal sensory nuclei of the cat, *J. Comp. Neurol.*, **253**, 121-133.
- Nomura, H., Ogawa, A., Tashiro, A., Morimoto, T., Hu, J.W. and Iwata, K. (2002), Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and nonnoxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection, *Pain*, **95**, 225-238.
- Nomura, S., Yasui, Y., Takada, M. and Mizuno, N. (1984), Trigeminal primary afferent neurons projecting directly to the solitary nucleus in the cat: a transganglionic and retrograde horseradish peroxidase study, *Neurosci. Lett.*, **50**, 257-262.
- Nord, S.G. (1967), Somatotopic organization in the spinal trigeminal nucleus, the dorsal column nuclei, and related structures in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **130**, 343-356.
- Nord, S.G. (1976), Responses of neurons in rostral and caudal trigeminal nuclei to tooth pulp stimulation, *Brain Res. Bull.*, **1**, 489-492.
- Nord, S.G. and Ross, G.S. (1973), Responses of trigeminal units in monkey bulbar lateral reticular formation to noxious and non-

- noxious stimulation of the face: experimental and theoretical considerations, *Brain Res.*, **58**, 385-399.
- Nord, S.G. and Young, R.F. (1975), Projection of tooth pulp afferents to the cat trigeminal nucleus caudalis, *Brain Res.*, **90**, 195-204.
- Nord, S.G. and Young, R.F. (1979), Effects of chronic descending tractotomy on the response patterns of neurons in the trigeminal nuclei principalis and oralis, *Exp. Neurol.*, **65**, 355-372.
- Novacek, M.J. (1992), Mammalian phylogeny: shaking the tree, *Nature*, **356**, 121-125.
- Nyberg, G. and Blomqvist, A. (1984), The central projection of muscle afferent fibers to the lower medulla and upper spinal cord: an anatomical study in the cat with the transganglionic transport method, *J. Comp. Neurol.*, **230**, 99-109.
- Nyberg, G. and Blomqvist, A. (1985), The somatotopic organization of forelimb cutaneous nerves in the brachial dorsal horn: an anatomical study in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **242**, 28-39.
- O'Flynn, N.M., Helme, R.D., Watkins, D.J. and Burcher, E. (1989), Autoradiographic localization of substance P binding sites in rat footpad skin, *Neurosci. Lett.*, **106**, 43-48.
- O'Connor, T.C. and Abram, S.E. (1995), Inhibition of nociception-induced spinal sensitization by anesthetic agents, *Anesthesiology*, **82**, 259-266.
- Oakden, E.L. and Boissonade, F.M. (1998), Fos expression in the ferret trigeminal nuclear complex following tooth pulp stimulation, *Neuroscience*, **84**, 1197-1208.
- Obersteiner, H. (1912), Anleitung beim Studium der nervösen Zentralorgane im gesunden und kranken Zustande, Leipzig, Deuticke.
- Ohya, A. (1992), Responses of trigeminal subnucleus interpolaris neurons to afferent inputs from deep oral structures, *Brain Res. Bull.*, **29**, 773-781.
- Ohya, A., Tsuruoka, M., Imai, E., Fukunaga, H., Shinya, A., Furuya, R., Kawawa, T. and Matsui, Y. (1993), Thalamic- and cerebellar-projecting interpolaris neuron responses to afferent inputs, *Brain Res. Bull.*, **32**, 615-621.
- Okamoto, K., Imbe, H., Tashiro, A., Kimura, A., Donishi, T., Tamai, Y. and Senba, E. (2005), The role of peripheral 5HT_{2A} and 5HT_{1A} receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation, *Neuroscience*, **130**, 465-474.
- Okamoto, K., Imbe, H., Tashiro, A., Kumabe, S. and Senba, E. (2004), Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat, *Neurosci. Lett.*, **367**, 259-263.
- Olgart, L.M., Gazelius, B., Brodin, E. and Pernow, B. (1977), Localization of substance P-like immunoreactivity in nerves in the tooth pulp, *Pain*, **4**, 153-159.
- Olsson, K.Å. and Westberg, K.G. (1991), Integration in the trigeminal premotor interneurons in the cat. 2. Functional characteristics of neurones in the subnucleus- γ of the oral nucleus of the spinal trigeminal tract with a projection to the digastric motoneurone subnucleus, *Exp. Brain Res.*, **84**, 115-124.
- Olsson, K.A., Lund, J.P., Valiquette, C. and Veilleux, D. (1988), Activity during mastication of periodontal mechanosensitive neurons of the trigeminal subnucleus oralis of the rabbit, *J. Neurophysiol.*, **59**, 341-357.
- Olzowski, J. (1950), On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus, *J. Comp. Neurol.*, **92**, 401-413.
- Onodera, H., Kogure, K., Ono, Y., Igarashi, K., Kiyota, Y. and Nagaoka, A. (1989), Proto-oncogene c-fos transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia, *Neurosci. Lett.*, **98**, 101-104.
- Painral, A.S. (1960), Functional analysis of group III afferent fibers of mammalian muscles, *J. Physiol. (Lond.)*, **152**, 250-270.
- Pajot, J., Pelissier, T., Sierralta, F., Raboisson, P. and Dallel, R. (2000), Differential effects of trigeminal tractotomy on A δ - and C-fiber-mediated nociceptive responses, *Brain Res.*, **863**, 289-292.
- Panneton, W.M. (1991), Primary afferent projections from the upper respiratory tract in the muskrat, *J. Comp. Neurol.*, **308**, 51-65.
- Panneton, W.M. and Burton, H. (1981), Corneal and periocular representation within the trigeminal sensory complex in the cat studied with transganglionic transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **199**, 327-344.
- Panneton, W.M. and Burton, H. (1985), Projections from the paratrigeminal nucleus and the medullary and spinal dorsal horns to the peribrachial area in the cat, *Neuroscience*, **15**, 779-797.
- Panneton, W.M., Johnson, S.N. and Christensen, N.D. (1994), Trigeminal projections to the peribrachial region in the muskrat, *Neuroscience*, **58**, 605-625.
- Papka, R.E., Furness, J.B., Della, N.G., Murphy, R. and Costa, M. (1984), Time course of

- effect of capsaicin on ultrastructure and histochemistry of substance P-immunoreactive nerves associated with the cardiovascular system of the guinea-pig, *Neuroscience*, **12**, 1277-1292.
- Parada, C.A., Luccarini, P. and Woda, A. (1997), Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up of neurons in the trigeminal oralis subnucleus, *Brain Res.*, **761**, 313-320.
- Park, S.J., Zhang, S., Chiang, C.Y., Hu, J.W., Dostrovsky, J.O. and Sessle, B.J. (2006), Central sensitization induced in thalamic nociceptive neurons by tooth pulp stimulation is dependent on the functional integrity of trigeminal brainstem subnucleus caudalis but not subnucleus oralis, *Brain Res.*, **1112**, 134-145.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986), The rat brain in stereotaxic coordinates, San Diego, Academic Press Inc.
- Pelissier, T., Pajot, J. and Dallel, R. (2002), The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine, *Pain*, **96**, 81-87.
- Peñarrocha, M., Silvestre, F.J. and Rodríguez, R. (1990), Douleur faciale d'origine cardiaque, *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, **91**, 477-479.
- Penn, R.D., Savoy, S.M., Corcos, D., Latash, M., Gottlieb, G., Parke, B. and Kroin, J.S. (1989), Intrathecal baclofen for severe spinal spasticity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 1517-1521.
- Perl, E.R. (1968), Myelinated afferent fibres innervating the primate skin and their response to noxious stimuli, *J. Physiol. London*, **197**, 593-615.
- Pertes, R.A. and Heir, G.M. (1991), Chronic orofacial pain, *Dental Clinics of North America*, **35**, 123-139.
- Pertovaara, A. and Tukeva, T. (1989), Effect of subcutaneous formalin treatment on responses to bulboreticular nociceptive neurons in the rat, *Brain Res. Bull.*, **23**, 457-462.
- Pertovaara, A., Huopaniemi, T., Aukee, K. and Carlson, S. (1987a), Tooth pulp-evoked activity in the spinal trigeminal nucleus caudalis of cat: Comparison to primary afferent fiber, reflex, and sensory responses, *Exp. Neurol.*, **95**, 155-166.
- Pertovaara, A., Huopaniemi, T., Carlson, S. and Jyväsjärvi, E. (1987b), Response characteristics of tooth pulp-driven postsynaptic neurons in the spinal trigeminal subnucleus interpolaris of the cat: comparison with primary afferent fiber, subnucleus caudalis, reflex, and sensory responses, *Brain Res.*, **422**, 205-217.
- Petersen, M. and LaMotte, R.H. (1993), Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells, *Pain*, **54**, 37-42.
- Peyronnard, J.M., Charron, L., Lavoie, J., Messier, J.P. and Dubreuil, M. (1988), Carbonic anhydrase and horseradish peroxidase: double labelling of rat dorsal root ganglion neurons innervating motor and sensory peripheral nerves, *Anat. Embryol.*, **177**, 353-359.
- Pfaller, K. and Arvidsson, J. (1988), Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin, *J. Comp. Neurol.*, **268**, 91-108.
- Phelan, K.D. and Falls, W.M. (1989a), An analysis of the cyto- and myeloarchitectonic organization of trigeminal nucleus interpolaris in the rat, *Somatosens. Mot. Res.*, **6**, 333-366.
- Phelan, K.D. and Falls, W.M. (1989b), The interstitial system of the spinal trigeminal tract in the rat: anatomical evidence for morphological and functional heterogeneity, *Somatosens. Mot. Res.*, **6**, 367-399.
- Pickoff-Matuk, J.F., Rosenfeld, J.P. and Broton, J.G. (1986), Lesions of the mid-spinal trigeminal complex are effective in producing perioral thermal hypoalgesia, *Brain Res.*, **382**, 291-298.
- Pierau, F.-K. and Szolcsányi, J. (1989), Neurogenic inflammation: axon reflex in pigs, *Agents Actions*, **26**, 231-232.
- Pini, A. (1983), Effects of capsaicin on conduction in a cutaneous nerve of the rat, *J. Physiol. (Lond.)*, **338**, 60P-61P.
- Pini, A., Baranowski, R. and Lynn, B. (1990), Long-term reduction in the number of C-fibre nociceptors following capsaicin treatment of a cutaneous nerve in adult rats, *Eur. J. Neurosci.*, **2**, 89-97.
- Pintér, E., Brown, B., Hoult, J.R. and Brain, S.D. (1999), Lack of evidence for tachykinin NK1 receptor-mediated neutrophil accumulation in the rat cutaneous microvasculature by thermal injury, *Eur. J. Pharmacol.*, **369**, 91-98.
- Pinto, M.L., de Cássia Machado, R., Schoorlemmer, G.H., Colombari, E. and de Cássia Ribeiro da Silva Lapa, R. (2006), Topographic organization of the projections from the interstitial system of the spinal trigeminal tract to the parabrachial nucleus in the rat, *Brain Res.*, **1113**, 137-145.
- Pohl, M., Benoliel, J.J., Bourgoïn, S., Lombard, M.C., Mauborgne, A., Taquet, H., Carayon, A., Besson, J.M., Cesselin, F. and Hamon, R.

- M. (1990), Regional distribution of calcitonin gene-related peptide-, substance P-, cholecystokinin-, met⁵-enkephalin-, and dynorphin A (1-8)-like materials in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult rats: effects of dorsal rhizotomy and neonatal capsaicin, *J. Neurochem.*, **55**, 1122-1130.
- Popovici, T., Barbin, G. and Ben-Ari, Y. (1988), Kainic acid induced seizures increase c-fos like protein in rat hippocampus, *Eur. J. Pharmacol.*, **150**, 405-406.
- Porro, C.A. and Cavazzuti, M. (1993), Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model, *Prog. Neurobiol.*, **41**, 565-607.
- Powell, J.J. and Todd, A.J. (1992), Light and electron microscope study of GABA-immunoreactive neurones in lamina III of rat spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **315**, 125-136.
- Presley, R.W., Menetrey, D., Levine, J.D. and Basbaum, A.I. (1990), Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein- like immunoreactivity in the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, **10**, 323-335.
- Price, D.D. and Browe, A.C. (1975), Spinal cord coding of graded nonnoxious and noxious temperature increases, *Exptl. Neurol.*, **48**, 210-221.
- Price, D.D. and Dubner, R. (1977), Neurons that subservise the sensory-discriminative aspects of pain, *Pain*, **3**, 307-338.
- Price, D.D. and Mayer, D.J. (1974), Physiological laminar organization of the dorsal horn of *M. mulatta*, *Brain Res.*, **79**, 321-325.
- Price, D.D. and Mayer, D.J. (1975), Neurophysiological characterization of anterolateral quadrant neurons subserving pain in *M. mulatta*, *Pain*, **1**, 59-72.
- Price, D.D., Dubner, R. and Hu, J.W. (1976), Trigeminothalamic neurons in nucleus caudalis responsive to tactile, thermal, and nociceptive stimulation of monkey's face, *J. Neurophysiol.*, **39**, 936-953.
- Price, D.D., Hu, J.W., Dubner, R. and Gracely, R.H. (1977), Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses, *Pain*, **3**, 57-68.
- Price, G.W., Kelly, J.S. and Bowery, N.G. (1987), The location of GABA_B receptor binding sites in mammalian spinal cord, *Synapse*, **1**, 530-538.
- Price, G.W., Wilkin, G.P., Turnbull, M.J. and Bowery, N.G. (1984), Are baclofen sensitive GABA_B receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord?, *Nature*, **307**, 71-74.
- Price, T.J. and Flores, C.M. (2007), Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse, *J. Pain.*, **8**, 263-272.
- Pubols, B.H. and Haring, J.H. (1995), The raccoon spinocervical and spinothalamic tracts: a horseradish peroxidase study, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **20**, 196-208.
- Puig, S. and Sorkin, L.S. (1995), Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity, *Pain*, **64**, 345-355.
- Quartu, M., Diaz, G., Floris, A., Lai, M.L., Priestley, J.V. and Del Fiacco M. (1992a), Calcitonin gene-related peptide in the human trigeminal sensory system at developmental and adult life stages: Immunohistochemistry, neuronal morphology and coexistence with substance P, *J. Chem. Neuroanat.*, **5**, 143-157.
- Quartu, M., Diaz, G., Lai, M.L., Del Fiacco, M. (1992b), Immunohistochemical localization of putative peptide neurotransmitters in the human trigeminal sensory system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **657**, 469-472.
- Raboisson, P. and Dallel, R. (2004), The orofacial formalin test, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **28**, 219-226.
- Raboisson, P., Bourdiol, P., Dallel, R., Clavelou, P. and Woda, A. (1991), Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat, *Neurosci. Lett.*, **125**, 179-182.
- Raboisson, P., Dallel, R. and Woda, A. (1989), Responses of neurones in the ventrobasal complex of the thalamus to orofacial noxious stimulation after large trigeminal tractotomy, *Exp. Brain Res.*, **77**, 569-576.
- Raboisson, P., Dallel, R., Clavelou, P., Sessle, B.J. and Woda, A. (1995), Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat, *J. Neurophysiol.*, **73**, 496-505.
- Ralevic, V., Khalil, Z., Dusting, G.J. and Helme, R.D. (1992), Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin microvasculature, *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 650-655.
- Ralston, III, H.J. and Ralston, D.D. (1979), The distribution of dorsal root axons in laminae I, II and III of the macaque spinal cord: a

- quantitative electron microscope study, *J. Comp. Neurol.*, **184**, 643-684.
- Ralston, III, H.J. and Ralston, D.D. (1982), The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord: A quantitative electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, **212**, 435-448.
- Ramón y Cajal, S. (1911), *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vols. 1 and 2, Instituto Ramón y Cajal, Madrid.
- Ran, W., Dean, M., Levine, R.A., Henkle, C. and Campisi, J. (1986), Induction of c-fos and c-myc mRNA by epidermal growth factor or calcium ionophore is cAMP dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8216-8220.
- Randic, M. and Miletic, V. (1979), Effect of substance P in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli, *Brain Res.*, **170**, 209-213.
- Ranson, S.W. (1913), The course within the spinal cord of the non-medullated fibres of the dorsal roots. A study of Lissauer's tract in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **23**, 259-281.
- Ranson, S.W. and Billingsley, P.R. (1916), The conduction of painful afferent impulses in the spinal nerves, *Amer. J. Physiol.*, **40**, 571-587.
- Rauscher, F.J., Cohen, D.R., Curran, T., Bos, T.J., Vogt, P.K., Bohmann, D., Tjian, R. and Franza, B.R. Jr. (1988a), Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene, *Science*, **240**, 1010-1016.
- Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J. and Spiegelman, B.M. (1988b), Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1, *Cell*, **52**, 471-480.
- Rauscher, F.J., Voulalas, P.J., Franza, B.R. Jr. and Curran, T. (1988c), Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution *in vitro*, *Genes Dev.*, **2**, 1687-1699.
- Reeh, P.W., Kocher, L. and Jung, S. (1986), Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of unmyelinated nociceptors in the rat?, *Brain Res.*, **384**, 42-50.
- Renhan, W.E., Jacquin, M.F., Mooney, R.D. and Rhoades, R.W. (1986), Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. II. Medullary dorsal horn cells, *J. Neurophysiol.*, **55**, 1187-1201.
- Réthelyi, M., Light, A.R. and Perl, E.R. (1989a), Synaptic ultrastructure of functionally and morphologically characterized neurons of the superficial spinal dorsal horn of cat, *J. Neurosci.*, **9**, 1846-1863.
- Réthelyi, M., Metz, C.B. and Lund, P.K. (1989b), Distribution of neurons expressing calcitonin gene-related peptide mRNAs in the brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea-pig, *Neuroscience*, **29**, 225-239.
- Réthelyi, M., Trevino, D.L. and Perl, E.R. (1979), Distribution of primary afferent fibers within the sacrococcygeal dorsal horn: an autoradiographic study, *J. Comp. Neurol.*, **185**, 603-622.
- Rexed, B. (1952), The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **96**, 415-496.
- Rexed, B. (1954), A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **100**, 297-379.
- Rexed, B., Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. In: Eccles, J.C. and Schade, J.P. (eds.), *Organization of the spinal cord*, Prog. Brain Res., Vol. 11, Amsterdam, Elsevier, 1964, pp. 58-92.
- Rhoades, R.W., Chiaia, N.L., Macdonald, G.J. and Jacquin, M.F. (1989), Effect of fetal infraorbital nerve transection upon trigeminal primary afferent projections in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **287**, 82-97.
- Ribeiro-da-Silva, A. and Coimbra, A. (1982), Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **209**, 176-186.
- Ritz, L.A. and Greenspan, J.D. (1985), Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **238**, 440-452.
- Ro, J.Y. and Capra, N.F. (1999), Evidence for subnucleus interparalis in craniofacial muscle pain mechanisms demonstrated by intramuscular injections with hypertonic saline, *Brain Res.*, **842**, 166-183.
- Ro, J.Y., Harriott, A., Crouse, U., Norman, F. and Capra, N.F. (2003), Innocuous jaw movements increase c-fos expression in trigeminal sensory nuclei produced by masseter muscle inflammation, *Pain*, **104**, 539-548.
- Roberts, L.A., Beyer, C. and Komisaruk, B.R. (1986), Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord, *Life Sci.*, **39**, 1667-1674.
- Robertson, B. and Arvidsson, J. (1985), Transganglionic transport of wheat germ agglutinin-HRP and cholera toxin-HRP in rat trigeminal primary sensory neurons, *Brain Res.*, **348**, 44-51.
- Robertson, B. and Grant, G. (1989), Immunocytochemical evidence for the localization of the GM1 ganglioside in

- carbonic anhydrase-containing and RT97-immunoreactive rat primary sensory neurons, *J. Neurocytol.*, **18**, 77-86.
- Rogers, L.R. (1984), Reactions of free-ranging black bears to capsaicin spray repellent, *Wildl. Soc. Bull.*, **12**, 59-61.
- Rolando, L. (1824), *Ricerca Anatomica sulla Struttura del Midollo Spinal*, Dalla Stamperia Reale, Torino.
- Rosene, D.L. and Mesulam, M.M. (1978), Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effects of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 28-39.
- Rosenfeld, J.P., Clavier, R.M. and Broton, J.G. (1978), Bilateral and unilateral antinociceptive effects of rostral trigeminal nuclear complex lesions in rats, *Brain Res.*, **157**, 147-152.
- Rosenfeld, M.G., Amara, S.G. and Evans, R.M. (1984), Alternative RNA processing: Determining neuronal phenotype, *Science*, **225**, 1315-1320.
- Rosenfeld, M.G., Mermod, J.-J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, R.E., Rivier, J., Vale, W.W. and Evans, R.M. (1983), Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing, *Nature*, **304**, 129-135.
- Rosland, J.H. (1991), The formalin test in mice: the influence of ambient temperature, *Pain*, **45**, 211-216.
- Rosland, J.H., Hunskaar, S. and Hole, K. (1987), The effect of diazepam on nociception in mice, *Pharmacol. Toxicol.*, **61**, 111-115.
- Rosland, J.H., Tjølsen, A., Mæhle, B. and Hole, K. (1990), The formalin test in mice: effect of formalin concentration, *Pain*, **42**, 235-242.
- Roveroni, R.C., Parada, C.A., Cecilia, M., Veiga, F.A. and Tambeli, C.H. (2001), Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test, *Pain*, **94**, 185-191.
- Ruda, M.A., Iadarola, M.J., Cohen, L.V. and Young, W.S. (1988), In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 622-626.
- Ruggiero, D.A., Ross, C.A. and Reis, D.J. (1981), Projections from the spinal trigeminal nucleus to the entire length of the spinal cord in the rat, *Brain Res.*, **225**, 225-233.
- Rustioni, A., Sanyal, S. and Kuypers, H.G.J.M. (1971), A histochemical study of the distribution of the trigeminal divisions in the substantia gelatinosa of the rat, *Brain Res.*, **32**, 45-52.
- Ryder, K., Lau, L.F. and Nathans, D. (1988), A gene activated by growth factors related to the oncogene *v-jun*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1487-1491.
- Saffen, D.W., Cole, A.J., Worley, P.F., Christy, B.A., Ryder, K. and Baraban, J.M. (1988), Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7795-7799.
- Sagar, S.M. and Sharp, F.R. (1990), Light induces a Fos-like nuclear antigen in retinal neurons, *Mol. Brain Res.*, **7**, 17-21.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R. and Curran, T. (1988), Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level, *Science*, **240**, 1328-1331.
- Sakamoto, N., Takatsuji, K., Shiosaka, S. and Tohyama, M. (1985), Evidence for the existence of substance P-like immunoreactive neurons in the human cerebral cortex: An immunohistochemical analysis, *Brain Res.*, **325**, 322-324.
- Salazar, L.R.M. (2005), Neurobiología de la transmisión sináptica gabaérgica, *Rev. Ecu. Neur.*, **14** (1-3).
- Sann, H., Harti, G., Pierau, F.-K. and Simon, E. (1987), Effect of capsaicin upon afferent and efferent mechanisms of nociception and temperature regulation in birds, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 1347-1354.
- Saporta, S. and Kruger, L. (1977), The organization of thalamocortical relay neurons in the rat ventrobasal complex studies by the retrograde transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **174**, 187-208.
- Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C. and Kuraishi, Y. (1998), Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus, *Neuroreport*, **9**, 2045-2048.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W., Kamps, M. and Verma, I.M. (1988a), *fos*-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1, *Cell*, **54**, 553-560.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C. and Verma, I.M. (1988b), Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*, *Nature*, **334**, 314-319.
- Sawynok, J. (1987), GABAergic mechanisms of analgesia: an update, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **26**, 463-474.
- Saxon, D.W. and Hopkins, D.A. (1998), Efferent and collateral organization of

- paratrigeminal nucleus projections: an anterograde and retrograde fluorescent tracer study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **402**, 93-110.
- Scadding, J.W. (1980), The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves, *J. Anat.*, **131**, 473-484.
- Schaible, H.G., Neugebauer, V., Cervero, F. and Schmidt, R.F. (1991), Changes in tonic descending inhibition of spinal neurons with articular input during the development of acute arthritis in the cat, *J. Neurophysiol.*, **66**, 1021-1032.
- Scheffler, N.M., Sheitel, P.L. and Lipton, M.N. (1991), Treatment of painful diabetic neuropathy with capsaicin, *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, **81**, 288-293.
- Schini, L., Katusic, Z.S. and Vanhoutte, P.M. (1990), Neurohypophyseal peptides and tachykinins stimulate the production of cyclic GMP in cultured porcine aortic endothelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 994-1000.
- Schoenen, J. (1973), Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in different mammals including man, *Acta Neurol. Belg.*, **73**, 348-358.
- Schöntal, A., Herrlich, P., Rohmsdorf, H.J. and Ponta, H. (1988), Requirement for *fos* gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters, *Cell*, **54**, 325-334.
- Schröder, H.D. (1977), Sulfide silver architectonic of the rat, cat, and guinea pig spinal cord: A light microscopic study with Timm's method for demonstration of heavy metals, *Anat. Embryol.*, **150**, 251-267.
- Segade, L.A.G. (1980), A modification of the tetramethylbenzidine method for the histochemical demonstration of horseradish peroxidase (HRP) under the light microscope, *Trab. Inst. Cajal*, **71**, 219-221.
- Segade, L.A.G. (1987), Pyrocatechol as a stabilizing agent for o-tolidine and o-dianisidine: a sensitive new method for HRP neurohistochemistry, *J. Hirnforsch.*, **28**, 331-340.
- Segade, L.A.G. (2003), Trigeminal primary afferent projections to the peribrachial area in the guinea pig, *Neurosci. Lett.*, **351**, 63-66.
- Segade, L.A.G., Labandeira-García, J.L. and Suárez-Núñez, J.M. (1980), Some considerations pertaining to the use of horseradish peroxidase (HRP) in neuroanatomy, *Trab. Inst. Cajal*, **71**, 5-23.
- Segade, L.A.G., Quintanilla, J.S., Mallo, M. and Segade, P.G. (1991), A comparative study of the transganglionic transport of cholera toxin-horseradish peroxidase (CT-HRP) and wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) in the trigeminal system of the guinea pig, *J. Hirnforsch.*, **32**, 249-255.
- Segade, L.A.G., Relova, J. and Gallego, R. (1992), *Fos* expression in the trigeminal sensory nuclei after a chemical lesion of the lower lip mucosa, *Neuroreport*, **3**, 665-668.
- Segade, L.A.G., Suárez-Quintanilla, J. and Cobos, A.R. (1990), Contralateral projections of trigeminal mandibular primary afferents in the guinea pig as seen by transganglionic transport of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, **506**, 267-280.
- Seki, Y. (1958), Observations on the spinal cord of the right whale, Tokyo, Scient. Reports of the Whales Res. Inst., n° 13, pp. 231-251.
- Sessle, B.J. (1987), The neurobiology of facial and dental pain: Present knowledge, future directions, *J. Dent. Res.*, **66**, 962-981.
- Sessle, B.J. and Greenwood, F. (1974), Influence of trigeminal nucleus caudalis on the responses of cat trigeminal brain stem neurones with orofacial mechanoreceptive fields, *Brain Res.*, **67**, 330-333.
- Sessle, B.J. and Greenwood, L.F. (1976), Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues. I. Responses to innocuous and noxious stimuli, *Brain Res.*, **117**, 211-226.
- Sessle, B.J. and Hu, J.W. (1981), Raphe-induced suppression of the jaw-opening reflex and single neurons in trigeminal subnucleus oralis, and influence of naloxone and subnucleus caudalis, *Pain*, **10**, 19-36.
- Sessle, B.J., Dubner, R., Greenwood, L.F. and Lucier, G.E. (1976), Descending influences of periaqueductal gray matter and somatosensory cerebral cortex in neurones in trigeminal brain stem nuclei, *Canad. J. Physiol. Pharm.*, **54**, 66-69.
- Sessle, B.J., Hu, J.W., Amano, N. and Zhong, G. (1986), Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck, and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive neurons in trigeminal subnucleus caudalis (Medullary dorsal horn) and its implications for referred pain, *Pain*, **27**, 219-235.
- Seybold, V. and Elde, R. (1980), Immunohistochemical studies of peptidergic neurons in the dorsal horn of the spinal cord, *J. Histochem. Cytochem.*, **28**, 367-370.
- Sharp, F.R., Gonzalez, M.F., Hisanaga, K., Mobley, W.C. and Sagar, S.M. (1989a),

- Induction of Fos-like immunoreactivity in rat forebrain following cortical lesions and NGF injections, *Neurosci. Lett.*, **100**, 117-122.
- Sharp, F.R., Gonzalez, M.F., Sharp, J.W. and Sagar, S.M. (1989b), c-fos expression and (14C) 2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation, *J. Comp. Neurol.*, **284**, 621-636.
- Sharp, F.R., Griffith, J., Gonzalez, M.F. and Sagar, S.M. (1989c), Trigeminal nerve section induces Fos-like immunoreactivity (FLI) in brainstem and decreases FLI in sensory cortex, *Mol. Brain Res.*, **6**, 217-220.
- Sharp, F.R., Sagar, S.M., Hicks, K., Lowenstein, D. and Hisanaga, K. (1991), c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress, *J. Neurosci.*, **11**, 2321-2331.
- Sharp, J.W., Sagar, S.M., Hisanaga, K., Jasper, P. and Sharp, F.R. (1990), The NMDA receptor mediates cortical induction of fos and fos-related antigens following cortical injury, *Exp. Neurol.*, **109**, 323-332.
- Sheng, M., Dougan, S.T., McFadden, G. and Greenberg, M.E. (1988), Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences, *Mol. Cell Biol.*, **8**, 2787-2796.
- Shigenaga, Y., Chen, I.C., Suemune, S., Nishimori, T., Nasution, I.D., Yoshida, A., Sato, H., Okamoto, T., Sera, M. and Hosoi, M. (1986a), Oral and facial representation within the medullary and upper cervical dorsal horns in the cat, *J. Comp. Neurol.*, **243**, 388-408.
- Shigenaga, Y., Nakatani, Z., Nishimori, T., Suemune, S., Kuroda, R. and Matano, S. (1983), The cells of origin of cat trigeminothalamic projections: especially in the caudal medulla, *Brain Res.*, **277**, 201-222.
- Shigenaga, Y., Nishimura, M., Suemune, S., Nishimori, T., Doe, K. and Tsuru, H. (1989), Somatotopic organization of tooth pulp primary afferent neurons in the cat, *Brain Res.*, **477**, 66-89.
- Shigenaga, Y., Okamoto, T., Nishimori, T., Suemune, S., Nasution, I.D., Chen, I.C., Tsuru, K., Yoshida, A., Tabuchi, K., Hosoi, M. and Tsuru, H. (1986b), Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat, *J. Comp. Neurol.*, **244**, 1-18.
- Shigenaga, Y., Otani, K. and Suemune, S. (1990), Morphology of central terminations of low-threshold trigeminal primary afferents from facial skin in the cat—Intra-axonal staining with HRP, *Brain Res.*, **523**, 23-50.
- Shigenaga, Y., Sakai, A. and Okada, K. (1976), Effects of tooth pulp stimulation in trigeminal nucleus caudalis and adjacent reticular formation in rat, *Brain Res.*, **103**, 400-406.
- Shigenaga, Y., Sera, M., Nishimori, T., Suemune, S., Nishimura, M., Yoshida, A. and Tsuru, K. (1988a), The central projection of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, **268**, 489-507.
- Shigenaga, Y., Suemune, S., Nishimura, M., Nishimori, T., Sato, H., Ishidori, H., Yoshida, A., Tsuru, K., Tsuiki, Y., Dateoka, Y., Nasution, I.D. and Hosoi, M. (1986c), Topographic representation of lower and upper teeth within the trigeminal sensory nuclei of adult cat as demonstrated by the transganglionic transport of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **251**, 299-316.
- Shigenaga, Y., Yoshida, A., Mitsuhiro, Y., Doe, K. and Suemune, S. (1988b), Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating periodontal ligament of the cat, *Brain Res.*, **448**, 331-338.
- Shigenaga, Y., Yoshida, A., Mitsuhiro, Y., Tsuru, K. and Doe, K. (1988c), Morphological and functional properties of trigeminal nucleus oralis neurons projecting to the trigeminal motor nucleus of the cat, *Brain Res.*, **461**, 143-149.
- Shimomura, Y., Kawada, T. and Suzuki, M. (1989), Capsaicin and its analogs inhibit the activity of NADH-Coenzyme Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 573-577.
- Shin, N.S., Lee, I.S., Yoon, Y.S. and Lee, H.S. (2003), Immunohistochemical localization of substance P, calcitonin gene-related peptide, galanin and calcium-binding proteins in trigeminal ganglia of goat (*Capra hircus*), *Anat. Histol. Embryol.*, **32**, 310-315.
- Shokunbi, M.T., Hrycyshyn, A.W. and Flumerfelt, B.A. (1985), Spinal projections to the lateral reticular nucleus in the rat: a retrograde labelling study using horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **239**, 216-226.
- Shorland, P., Woolf, C.J. and Fitzgerald, M. (1989), Morphology and somatotopic organization of the central terminals of hindlimb hair follicle afferents in the rat

- lumbar cord, *J. Comp. Neurol.*, **289**, 416-433.
- Silverman, J.D. and Kruger, L. (1987), An interpretation of dental innervation based upon the pattern of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive thin sensory axons, *Somatosens. Res.*, **5**, 157-175.
- Silverman, J.D. and Kruger, L. (1988), Lectin and neuropeptide labelling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated "nociceptor" thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations, *Somatosens. Res.*, **5**, 259-267.
- Simons, C.T., Sudo, S., Sudo, M. and Carstens, E. (2004), Mustard oil has differential effects on the response of trigeminal caudalis neurons to heat and acidity, *Pain*, **110**, 64-71.
- Sjöqvist, O. (1938), Studies on pain conduction in the trigeminal nerve, *Acta Psychiat. Neurol. Scand. (Suppl.)*, **17**, 1-139.
- Skofitsch, G. and Jacobowitz, D.M. (1985a), Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system, *Peptides*, **6**, 721-745.
- Skofitsch, G. and Jacobowitz, D.M. (1985b), Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat, *Peptides*, **6**, 747-754.
- Skofitsch, G., Zamir, N., Helke, C.J., Savitt, J.M. and Jacobowitz, D.M. (1985), Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in sensory ganglia and capsaicin sensitive neurons of the rat central nervous system: colocalization with other neuropeptides, *Peptides*, **6**, 307-318.
- Slugg, R.M. and Light, A.R. (1994), Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin, *J. Comp. Neurol.*, **339**, 49-61.
- Smith, R.L. (1973), The ascending fiber projections from the principal sensory trigeminal nucleus in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **148**, 423-446.
- Smyth, G.E. (1939), Systematization and central connections of spinal tract and nucleus trigeminal; clinica and pathological study, *Brain*, **82**, 41-87.
- Somana, R., Kotchabhakdi, N. and Walberg, F. (1980), Cerebellar afferents from the trigeminal sensory nuclei in the cat, *Exp. Brain Res.*, **38**, 57-64.
- Sommer, E.W., Kazimierczak, J. and Droz, B. (1985), Neuronal subpopulations in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features, *Brain Res.*, **346**, 310-326.
- Sonnenberg, J.L., Macgregor-Leon, P.F., Curran, T. and Morgan, J.I. (1989a), Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure, *Neuron*, **3**, 359-365.
- Sonnenberg, J.L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P.F., Hempstead, J., Morgan, J.I. and Curran, T. (1989b), Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain, *J. Neurosci. Res.*, **24**, 72-80.
- Sonnenberg, J.L., Rauscher, F.J., Morgan, J.I. and Curran, T. (1989c), Regulation of proenkephalin by Fos and Jun, *Science*, **246**, 1622-1625.
- Sotgiu, M.L. (1989), Supraspinal inhibition of the two components of formalin-induced responses in rat dorsal horn neurons, *Arch. Ital. Biol.*, **127**, 219-223.
- Spath, E. and Darling, S.F. (1930), Synthesis of capsaicin, *Ber. Chem. Ges.*, **63B**, 737-740.
- Spiller, W.G. (1915), Remarks on the central representation of sensation, *J. Nerv. Ment. Dis.*, **42**, 399-418.
- Spreafico, R., Frassoni, C., Arcelli, P. and De Biasi, S. (1994), GABAergic interneurons in the somatosensory thalamus of the guinea-pig: a light and ultrastructural immunocytochemical investigation, *Neuroscience*, **59**, 961-973.
- Steindler, D.A. (1977), Trigemino-cerebellar projections in normal and reeler mutant mice, *Neurosci. Lett.*, **6**, 293-300.
- Steindler, D.A. (1985), Trigemino-cerebellar, trigeminotectal, and trigeminothalamic projections: a double retrograde axonal tracing study in the mouse, *J. Comp. Neurol.*, **237**, 155-175.
- Steiner, T.J. and Turner, L.M. (1972), Cytoarchitecture of the rat spinal cord, *J. Physiol. (London)*, **222**, 123P-125P.
- Stenholm, E., Bongenhielm, U., Ahlquist, M. and Fried, K. (2002), VRL- and VRL-I-like immunoreactivity in normal and injured trigeminal dental primary sensory neurons of the rat, *Acta Odontol. Scand.*, **60**, 72-79.
- Stewart, W.A. and King, R.B. (1963), Fiber projections from the nucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus, *J. Comp. Neurol.*, **121**, 271-286.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2003), ANKTM1, a TRP-

- like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures, *Cell*, **112**, 819-829.
- Stover, J.D., Schwab, C.A. and Matthews, M.A. (1992), Selective deafferentation of convergent inputs to trigeminal subnucleus caudalis: Effects on calcitonin gene-related peptide distribution, *Somatosens. Mot. Res.*, **9**, 107-130.
- Strassman, A.M. and Vos, B.P. (1993), Somatotopic and laminar organization of Fos-like immunoreactivity in the medullary and upper dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **331**, 495-516.
- Strassman, A.M., Vos, B.P., Mineta, Y., Naderi, S., Borsook, D. and Burstein, R. (1993), Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat, *J. Neurophysiol.*, **70**, 1811-1821.
- Straus, W. (1964), Factors affecting the cytochemical reaction of peroxidase with benzidine and the stability of the blue reaction product, *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 462-469.
- Such, G. and Jancsó, G. (1986), Axonal effects of capsaicin: an electrophysiological study, *Acta Physiol. Hung.*, **67**, 53-63.
- Sugimoto, T. and Takemura, M. (1993), Tooth pulp primary neurons: cell size analysis central connection and carbonic anhydrase activity, *Brain Res. Bull.*, **30**, 221-226.
- Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., He, Y.F., Xiao, C. and Ichikawa, H. (1997b), Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase, *Neurosci. Res.*, **28**, 361-371.
- Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., Xiao, C., He, Y.F. and Ichikawa, H. (1997a), Central projection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) immunoreactive trigeminal primary neurons in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **378**, 425-442.
- Sugimoto, T., Hara, T., Shirai, H., Abe, T., Ichikawa, H. and Sato, T. (1994), c-Fos induction in the subnucleus caudalis following noxious mechanical stimulation of the oral mucous membrane, *Exp. Neurol.*, **129**, 251-256.
- Sugimoto, T., He, Y.F., Funahashi, M. and Ichikawa, H. (1998b), Induction of immediate-early genes *c-fos* and *zif268* in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation, *Brain Res.*, **794**, 353-358.
- Sugimoto, T., He, Y.F., Xiao, C. and Ichikawa, H. (1998a), c-fos induction in the subnucleus oralis following trigeminal nerve stimulation, *Brain Res.*, **783**, 158-162.
- Sugimoto, T., Takemura, M. and Mukai, N. (1990), Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity within the mandibular molar and incisor tooth pulps of the rat, *Brain Res.*, **529**, 245-254.
- Sugimoto, T., Xiao, C. and Ichikawa, H. (1998c), Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves an apoptotic mechanism, *Brain Res.*, **807**, 147-154.
- Suh, Y.S., Chung, K. and Coggeshall, R.E. (1984), A study of axonal diameters and areas in lumbosacral roots and nerves in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **222**, 473-481.
- Sumino, R., Central neural pathways involved in the jaw opening reflex in the cat. In: Dubner, R. and Kawamura, Y. (eds.): Oral Facial Sensory and Motor Mechanisms, New York, Appleton-Century-Crofts, 1971, pp. 315-331.
- Sumino, R., Nozaki, S. and Katoh, M. Trigemino-neck reflex. In: Kawamura, Y. and Dubner, R. (eds.): Oral-Facial Sensory and Motor Functions, Tokyo, Quintessence, 1981, pp. 81-88.
- Svensson, P., Houe, L. and Arendt-Nielsen, L. (1997), Bilateral experimental muscle pain changes electromyographic activity of human jaw-closing muscles during mastication, *Exp. Brain Res.*, **116**, 182-185.
- Szallasi, A. (1995), Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man, *Acta Physiol. Scand. (Suppl.)*, **155**, 629, 1-68.
- Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1990), Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes, *Brain Res.*, **524**, 106-111.
- Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1999), Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 159-211.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., Nilsson, S., Hökfelt, T. and Lundberg, J.M. (1994), Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig, and man, *Eur. J. Pharmacol.*, **264**, 217-221.
- Szallasi, A., Lewin, N.E. and Blumberg, P.M. (1993), Vanilloid (capsaicin) receptor in the

- rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 678-683.
- Szekely, A.M., Barbaccia, M.L. and Costa, E. (1987), Activation of specific glutamate receptor subtypes increases *c-fos* proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells, *Neuropharmacology*, **26**, 1779-1782.
- Szekely, A.M., Barbaccia, M.L., Alho, H. and Costa, E. (1989), In primary cultures of cerebellar granule cells the activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induces *c-fos* mRNA expression, *Mol. Pharmacol.*, **35**, 401-408.
- Szolcsányi, J. (1977), A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain, *J. Physiol. Paris*, **73**, 251-259.
- Szolcsányi, J. (1983), Disturbances of thermoregulation induced by capsaicin, *J. Therm. Biol.*, **8**, 207-212.
- Szolcsányi, J. (1987), Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation, *J. Physiol. (Lond.)*, **388**, 9-23.
- Szolcsányi, J., Capsaicin, irritation, and desensitization. Neurophysiological basis and future perspectives. In: Green, B.G., Mason, J.R. and Kare, M.R. (eds.): Irritation, Chemical Senses, Vol. 2, Marcel Dekker, New York and Basel, 1990, pp. 141-168.
- Szolcsányi, J. and Jancsó-Gábor, A. (1975), Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents, *Drug Res.*, **25**, 1877-1881.
- Szolcsányi, J., Anton, F., Reeh, P.W. and Handwerker, H.O. (1988), Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin, *Brain Res.*, **446**, 262-268.
- Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A. and Joó, F. (1975), Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **287**, 157-169.
- Szolcsányi, J., Sann, H. and Pierau, F.-K. (1986), Nociception in pigeons is not impaired by capsaicin, *Pain*, **27**, 247-260.
- Tabata, T. and Karita, K. (1991), Response properties of periodontal mechanosensitive neurons in the trigeminal spinal tract nucleus of the cat, *Somatosens. Mot. Res.*, **8**, 261-269.
- Taber, E. (1961), The cytoarchitecture of the brain stem of the cat. 1. Brain stem nuclei of cat, *J. Comp. Neurol.*, **116**, 27-70.
- Takeda, M., Tanimoto, T., Ikeda, M., Kadoi, J. and Matsumoto, S. (2004), Activation of GABA_B receptor inhibits the excitability of rat small diameter trigeminal root ganglion neurons, *Neuroscience*, **123**, 491-505.
- Takemura, M., Nagase, Y., Yoshida, A., Yasuda, K., Kitamura, S., Shigenaga, Y. and Matano, S. (1993), The central projection of the monkey tooth pulp afferent neurons, *Somatosens. Mot. Res.*, **10**, 217-227.
- Takemura, M., Shimada, T. and Shigenaga, Y. (2000b), GABA_A receptor-mediated effects on expression of c-Fos in rat trigeminal nucleus following high- and low-intensity afferent stimulation, *Neuroscience*, **98**, 325-332.
- Takemura, M., Shimada, T. and Shigenaga, Y. (2001), GABA_B receptor-mediated effects on expression of c-Fos in rat trigeminal nucleus following high- and low-intensity afferent stimulation, *Neuroscience*, **103**, 1051-1058.
- Takemura, M., Shimada, T., Sugiyo, S., Nokubi, T. and Shigenaga, Y. (2000a), Mapping of c-Fos in the trigeminal sensory nucleus following high- and low-intensity afferent stimulation in the rat, *Exp. Brain Res.*, **130**, 113-123.
- Takemura, M., Sugimoto, T. and Sakai, A. (1987), Topographic organization of central terminal region of different sensory branches of the rat mandibular nerve, *Exp. Neurol.*, **96**, 540-557.
- Takemura, M., Sugimoto, T. and Shigenaga, Y. (1991), Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat, *Exp. Neurol.*, **111**, 324-331.
- Takemura, M., Sugiyo, S., Moritani, M., Kobayashi, M. and Yonehara, N. (2006), Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system, *Arch. Histol. Cytol.*, **69**, 79-100.
- Tashiro, T., Takahashi, O., Satoda, T., Matsushima, R., Uemura-Sumi, M. and Mizuno, N. (1991), Distribution of axons showing calcitonin gene-related peptide- and/or substance P-like immunoreactivity in the sensory trigeminal nuclei of the cat, *Neurosci. Res.*, **11**, 119-133.
- Taylor, B.K., Peterson, M.A. and Basbaum, A.I. (1995), Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input, *J. Neurosci.*, **15**, 7575-7584.

- Taylor, B.K., Peterson, M.A. and Basbaum, A.I. (1997), Early nociceptive events influence the temporal profile, but not the magnitude, of the tonic response to subcutaneous formalin: effects with remifentanyl, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 876-883.
- Terashima, S. and Liang, Y.-F. (1991), Temperature neurons in the crotaline trigeminal ganglia, *J. Neurophysiol.*, **66**, 623-634.
- Thresh, L.T. (1846), Isolation of capsaicin, *Pharm. J.*, **6**, 941.
- Tiwari, R.K. and King, R.B. (1974), Fiber projections from trigeminal nucleus caudalis in primate (squirrel monkey and baboon), *J. Comp. Neurol.*, **158**, 191-205.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. and Hole, K. (1992), The formalin test: an evaluation of the method, *Pain*, **51**, 5-17.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I. and Julius, D. (1998), The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli, *Neuron*, **21**, 531-543.
- Torebjörk, H.E. and Hallin, R.G. (1974), Identification of afferent C units in intact human skin nerves, *Brain Res.*, **67**, 387-403.
- Torvik, A. (1956), Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures, *J. Comp. Neurol.*, **106**, 51-141.
- Torvik, A. (1957), Ascending fibers from the main trigeminal sensory nucleus. An experimental study in the cat, *Amer. J. Anat.*, **100**, 1-16.
- Traub, R.J., Allen, B., Humphrey, A. and Ruda, M.A. (1990), Analysis of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the cat dorsal spinal cord and dorsal root ganglia provides evidence for a multisegmental projection of nociceptive C-fiber primary afferents, *J. Comp. Neurol.*, **302**, 562-574.
- Treisman, R. (1985), Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences, *Cell*, **42**, 889-902.
- Tsuru, K., Otani, K., Kajiyama, K., Suemune, S. and Shigenaga, Y. (1989), Central terminations of periodontal mechanoreceptive and tooth pulp afferents in the trigeminal principal and oral nuclei of the cat, *Brain Res.*, **485**, 29-61.
- Turner, D.F. and Marfurt, C.F. (1988), Uptake and transneuronal transport of horseradish peroxidase-wheat germ agglutinin by tooth pulp primary afferent neurons, *Brain Res.*, **452**, 381-387.
- Turner, R. and Tjian, R. (1989), Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers, *Science*, **243**, 1689-1694.
- Ujihara, H., Sasa, M., Fujita, Y. and Takaori, S. (1987), Opioid-mediated inhibition from the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus to the neurons in the subnucleus oralis, *Brain Res.*, **418**, 52-57.
- Unger, J.W. and Lange, W. (1991), Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and spinal cord, *J. Chem. Neuroanat.*, **4**, 299-309.
- Van Beveren, C., Van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. and Verma, I.M. (1983), Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini, *Cell*, **32**, 1241-1255.
- Verburgh, C.A., Voogd, J., Kuypers, H.G. and Stevens, H.P. (1990), Propriospinal neurons with ascending collaterals to the dorsal medulla, the thalamus and the tectum: a retrograde fluorescent double-labeling study of the cervical cord of the rat, *Exp. Brain Res.*, **80**, 577-590.
- Verhaart, W.J.C. (1964), A Stereotaxic Atlas of the Brain Stem of the Cat, Van Gorcum, Assen.
- Verrier, B., Muller, D., Bravo, R. and Muller, R. (1986), Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene, *EMBO J.*, **5**, 913-917.
- Villablanca, J.R. and Olmstead, C.E. (1979), Neurological development of kittens, *Dev. Psychobiol.*, **12**, 101-127.
- Villanueva, L., Bouhassira, D., Bing, Z., Le Bars, D. (1988), Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla, *J. Neurophysiol.*, **60**, 980-1009.
- Villanueva, L., Bing, Z., Bouhassira, D., Le Bars, D. (1989), Encoding of electrical, thermal, and mechanical noxious stimuli by subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla, *J. Neurophysiol.*, **61**, 391-402.
- Voisin, D.L., Doméjen-Orliaguet, S., Chalus, M., Dallel, R. and Woda, A. (2002), Ascending connections from the caudal part to the oral part of the spinal trigeminal nucleus in the rat, *Neuroscience*, **189**, 183-193.
- Vos, B.P. and Strassman, A.M. (1995), Fos expression in the medullary dorsal horn of the rat after chronic constriction injury to

- the infraorbital nerve, *J. Comp. Neurol.*, **357**, 362-375.
- Vyklicky, L. and Keller, D. (1973), Central projection of tooth pulp primary afferents in the cat, *Acta Neurobiol. Exp.*, **33**, 803-809.
- Vyklicky, L., Keller, O., Jastreboff, P., Vyklicky, L. Jr. and Butkhuzi, S.M. (1977), Spinal trigeminal tractotomy and nociceptive reactions evoked by tooth pulp stimulation in the cat, *J. Physiol.*, **73**, 379-386.
- Wakisaka, S., Nishikawa, S., Ichikawa, H., Matsuo, S., Takano, Y. and Akai, M. (1985), The distribution and origin of substance P-like immunoreactivity in the rat molar pulp and periodontal tissues, *Arch. Oral Biol.*, **30**, 813-818.
- Waldeyer, H. (1888), *Das Gorilla-Rückenmark*, Anhang. Abh. Kgl. Preuss. Akad. Wiss. Phys.-math., Berlin, **3**, pp. 1-147.
- Wall, P.D. and Melzack, R. (1984), *Textbook of pain*, New York, Churchill-Livingstone.
- Wall, P.D. and Taub, A. (1962), Four aspects of trigeminal nucleus and a paradox, *J. Neurophysiol.*, **25**, 110-126.
- Walther, D., Takemura, M. and Uhl, G.R. (1993), Fos family member changes in nucleus caudalis neurons after primary afferent stimulation: enhancement of fos B and c-fos, *Mol. Brain Res.*, **17**, 155-159.
- Wang, L.G., Li, H.M. and Li, J.S. (1994), Formalin induced FOS-like immunoreactive neurons in the trigeminal spinal caudal subnucleus project to contralateral parabrachial nucleus in the rat, *Brain Res.*, **649**, 62-70.
- Watson, C.P.N., Evans, R.J. and Watt, V.R. (1988), Postherpetic neuralgia and topical capsaicin, *Pain*, **33**, 333-340.
- Watson, C.R. and Switzer, R.C. (1978), Trigeminal projections to cerebellar tactile areas in the rat—origin mainly from N. interpolaris and N. principalis, *Neurosci. Lett.*, **10**, 77-82.
- Weihe, E., Iadarola, M.J., Nohr, D., Müller, S., Millan, M.J., Yanaihara, N., Stein, C. and Herz, A. (1990), Sustained expression and colocalization of proenkephalin and prodynorphin opioids and c-fos protein in dorsal horn neurons revealed in arthritic rats. In: van Ree JM., Mulder AH, Wiegant VM, van Wimersma TB (eds). *New Leads in Opiate Research*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 92-94.
- Weinberger, L.M. and Grant, F.C. (1942), Experiences with intramedullary tractotomy. III. Studies in sensation, *Arch. Neurol. Psychiat.*, **48**, 355-381.
- Welker, C. (1971), Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of SmI cerebral neocortex in albino rat, *Brain Res.*, **26**, 259-275.
- Westrum, L.E., Canfield, R.C. and O'Connor, T.A. (1980), Projections from dental structures to the brain stem trigeminal complex as shown by transganglionic transport of horseradish peroxidase, *Neurosci. Lett.*, **20**, 31-36.
- Westrum, L.E., Canfield, R.C. and O'Connor, T.A. (1981), Each canine tooth projects to all brain stem trigeminal nuclei in cat, *Exp. Neurol.*, **74**, 787-799.
- Wheeler-Aceto, H. and Cowan, A. (1991), Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics, *Psychopharmacology*, **104**, 35-44.
- Wheeler-Aceto, H., Porreca, F. and Cowan, A. (1990), The rat paw formalin test: comparison of noxious agents, *Pain*, **40**, 229-238.
- White, J.D. and Gall, C.M. (1987), Differential regulation of neuropeptide and proto-oncogene mRNA content in the hippocampus following recurrent seizures, *Mol. Brain Res.*, **3**, 21-29.
- Whittle, B.J.R., Lopez-Belmonte, J. and Rees, D.D. (1989), Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation, *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 646-652.
- Wiberg, M. and Blomqvist, A. (1984), The spinomesencephalic tract in the cat: its cells of origin and termination pattern as demonstrated by the intraaxonal transport method, *Brain Res.*, **291**, 1-18.
- Wiertelak, E.P., Furness, L.E., Horan, R., Martinez, J., Maier, S.F. and Watkins, L.R. (1994), Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade, *Brain Res.*, **649**, 19-26.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A. and Fischer, J.A. (1984), Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat, *Neurosci. Lett.*, **52**, 199-204.
- Williams, S., Evan, G.I. and Hunt, S.P. (1990), Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat, *Neuroscience*, **36**, 73-81.
- Williams, S., Pini, A., Evan, G. and Hunt, S.P., Molecular events in the spinal cord following sensory stimulation. In: Cervero, F., Bennett, G.J. and Headley, P.M. (eds): *Processing of sensory information in the*

- superficial dorsal horn of the spinal cord, New York, Plenum Press, 1989, pp. 273-284.
- Willis, W.D.Jr., Visceral inputs to sensory pathways in the spinal cord. In: Cervero, F. and Morrison, J.F.B. (eds.): Visceral Sensation, Prog. Brain Res., Vol. 67, Amsterdam, Elsevier, pp. 207-226.
- Willis, W.D.Jr., Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. In: Fields, H.L. and Besson, J.-M. (eds.): Pain Modulation, Prog. Brain Res., Vol. 77, Amsterdam, Elsevier, 1988pp. 1-30.
- Willis, W.D., Kenshalo, D.R. Jr. and Leonard, R.B. (1979), The cells of origin of the Primate spinothalamic tract, *J. Comp. Neurol.*, **4**, 543-573.
- Willis, W.D., Trevino, D.L., Coulter, J.D. and Maunz, R.A. (1974), Responses of primate spinothalamic tract neurons to natural stimulation of hindlimb, *J. Neurophysiol.*, **37**, 358-372.
- Winter, J., Dray, A., Wood, J.N., Yeats, J.C. and Bevan, S. (1990), Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin, *Brain Res.*, **520**, 131-140.
- Woda, A., Azerad, J. and Albe-Fessard, D. (1977), Mapping of the trigeminal sensory complex of the cat: characterization of its neurons by stimulations of peripheral fields, dental pulp afferents and thalamic projections, *J. Physiol.*, **73**, 367-818.
- Woda, A., Azerad, J. and Albe-Fessard, D. (1983), The properties of cells in the cat trigeminal main sensory and spinal subnuclei activated by mechanical stimulation of the periodontium, *Arch. Oral. Biol.*, **28**, 419-422.
- Wolvetang, E.J., Larm, J.A., Moutsoulas, P. and Lawen, A. (1996), Apoptosis induced by inhibitors of the plasma membrane NADH-oxidase involves Bcl-2 and calcineurin, *Cell Growth Diff.*, **7**, 1315-1325.
- Wong-Riley, M.T. (1976), Endogenous peroxidatic activity in brain stem neurons as demonstrated by their staining with diaminobenzidine in normal squirrel monkeys, *Brain Res.*, **108**, 257-277.
- Wood, J.N., Coote, P.R., Minhas, A., Mullaney, I., McNeill, M. and Burgess, G.M. (1989), Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurones in culture, *J. Neurochem.*, **53**, 1203-1211.
- Wood, J.N., Winter, J., James, I.F., Rang, H.P., Yeats, J. and Bevan, S. (1988), Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture, *J. Neurosci.*, **8**, 3208-3220.
- Woodburne, R.T. (1936), A phylogenetic consideration of the primary and secondary centers and connections of the trigeminal complex in a series of vertebrates, *J. Comp. Neurol.*, **65**, 403-502.
- Woolf, C.J. and Doubell, T.P. (1994), The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A β -fiber inputs, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **4**, 525-534.
- Woolf, C.J. and Wall, P.D. (1982), Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fiber mediated inhibition of rat dorsal horn neurones, *Brain Res.*, **242**, 77-85.
- Woolf, C.J. and Wall, P.D. (1986), Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat, *J. Neurosci.*, **6**, 1433-1442.
- Woolston, D.C., La Londe, J.R. and Gibson, J.M. (1982), Comparison of response properties of cerebellar- and thalamic-projecting interpolaris neurons, *J. Neurophysiol.*, **48**, 160-173.
- Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M.J., Fahrenkrug, J. and Hökfelt, T. (1990), On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: studies on spinal reflex excitability and peripheral axotomy, *Eur. J. Neurosci.*, **2**, 733-743.
- Yaksh, T.L., Jessell, T.M., Gamse, R., Mudge, A.W. and Leeman, S.E. (1980), Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo, *Nature*, **286**, 155-157.
- Yamamoto, A.I. and Senba, E. (1990), Cell types and axonal sizes of calcitonin gene-related peptide-containing primary sensory neurons of the rat, *Brain Res. Bull.*, **24**, 759-764.
- Yamashiro, T., Nakagawa, K., Satoh, K., Moriyama, H. and Takada, K. (1997), c-fos expression in the trigeminal sensory complex and pontine parabrachial areas following experimental tooth movement, *Neuroreport*, **8**, 2351-2353.
- Yasuhara, O., Aimi, Y., Shibano, A. and Kimura, H. (2007), Primary sensory neurons containing choline acetyltransferase of the peripheral type in the rat trigeminal ganglion and their relation to neuropeptides-, calbindin- and nitric oxide synthase-containing cells, *Brain Res.*, **1141**, 92-98.
- Yasui, Y., Itoh, K., Mizuno, N., Nomura, S., Takada, M., Konishi, A. and Kudo, M. (1983), The posteromedial ventral nucleus

- of the thalamus (VPM) of the cat: direct ascending projections to the cytoarchitectonic subdivisions, *J. Comp. Neurol.*, **220**, 219-228.
- Yeziarski, R.P. (1988), Spinomesencephalic tract: projections from the lumbosacral spinal cord of the rat, cat and monkey, *J. Comp. Neurol.*, **267**, 131-146.
- Yokota, T. (1975), Excitation of units in marginal rim of trigeminal subnucleus caudalis elicited by tooth pulp stimulation, *Brain Res.*, **95**, 154-158.
- Yokota, T. and Matsumoto, N. (1983a), Somatotopic distribution of trigeminal nociceptive specific neurons within the caudal somatosensory thalamus of the cat, *Neurosci. Lett.*, **39**, 125-130.
- Yokota, T. and Matsumoto, N. (1983b), Location and functional organization of trigeminal wide dynamic range neurons within the nucleus ventralis postero medialis of the cat, *Neurosci. Lett.*, **39**, 231-236.
- Yokota, T., Koyama, N., Nishikawa, Y., Nishikawa, N., Nishida, Y., Hasegawa, A. and Fujino, Y. (1991), Trigeminal nociceptive neurons in the subnucleus reticularis ventralis. I. Response properties and afferent connections, *Neurosci. Res.*, **11**, 1-17.
- Yokota, T., Nishikawa, N. and Nishikawa, Y. (1979), Trigeminal nociceptive neurons in the trigeminal subnucleus caudalis and bulbar lateral reticular formation, *Adv. Pain Res. Ther.*, **3**, 211-217.
- Yokota, T., Nishikawa, N. and Nishikawa, Y., Brain stem mechanisms of oral facial pain. In: Kawamura, Y. and Dubner, R. (eds.): Oral-Facial Sensory and Motor Functions, Tokyo, Quintessence, 1981, pp. 121-132.
- Yoshida, A., Chen, K., Moritani, M., Yabuta, N.H., Nagase, Y., Takemura, M. and Shigenaga, Y. (1997), Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory complex and spinal dorsal horn in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **383**, 94-111.
- Yoshida, A., Yasuda, K., Dostrovsky, J.O., Bae, Y.C., Takemura, M., Shigenaga, Y. and Sessle, B.J. (1994), Two major types of premotoneurons in the feline trigeminal nucleus oralis as demonstrated by intracellular staining with horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, **347**, 495-514.
- Young, R.F. (1982), Effects of trigeminal tractotomy on dental sensation in humans, *J. Neurosurg.*, **56**, 812-818.
- Young, R.F. and King, R.B. (1972), Excitability changes in trigeminal primary afferent fibers in response to noxious and nonnoxious stimuli, *J. Neurophysiol.*, **35**, 87-95.
- Young, R.F. and Perryman, K.M. (1984), Pathways for orofacial pain sensation in the trigeminal brain stem nuclear complex of the macaque monkey, *J. Neurosurg.*, **61**, 563-568.
- Young, R.F. and Perryman, K.M. (1986), Neuronal responses in rostral trigeminal brain-stem nuclei of macaque monkeys after chronic trigeminal tractotomy, *J. Neurosurg.*, **65**, 508-516.
- Young, R.F., Oleson, T. and Perryman, K. (1981), Effect of trigeminal tractotomy on behavioral response to dental pulp stimulation in the monkey, *J. Neurosurg.*, **55**, 420-430.
- Zeman, W. and Innes, J.R.M. (1963), Craigie's Neuroanatomy of the Rat, New York, Academic Press, pp. 230.
- Zerari-Mailly, F., Pinganaud, G., Dauvergne, C., Buisseret, P. and Buisseret-Delmas, C. (2001), Trigemino-reticulo-facial and trigemino-reticulo-hypoglossal pathways in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **429**, 80-93.
- Zhang, D.X., Carlton, S.M., Sorkin, L.S. and Willis, W.D. (1990), Collaterals of primate spinothalamic tract neurons to the periaqueductal gray, *J. Comp. Neurol.*, **296**, 277-290.
- Zhang, S., Chiang, C.Y., Xie, Y.F., Park, S.J., Lu, Y., Hu, J.W., Dostrovsky, J.O. and Sessle, B.J. (2006), Central sensitization in thalamic nociceptive neurons induced by mustard oil application to rat molar tooth pulp, *Neuroscience*, **142**, 833-842.
- Zimmermann, M. (1983), Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals, *Pain*, **16**, 109-110.
- Zorumski, C.F. and Isenberg, K.E. (1991), Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, **148**, 162-173.

