



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
Y LOGOPEDIA

Control central de la vocalización: efectos de la estimulación eléctrica de regiones hipotalámicas sobre la actividad laríngea

Trabajo de Laura Carrillo Franco,
tutorizado por Manuel Víctor López González y Marta González García

Resumen

La estimulación del núcleo hipotalámico dorsomedial y el área perifornical (DMH-PeF) en ratas provoca una respuesta cardiorrespiratoria caracterizada por un aumento de presión arterial, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria. En determinados estudios (Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2018), se ha demostrado una interacción funcional entre el DMH-PeF y estructuras pontinas (área A5 y complejo parabraquial) que, a su vez, también están conectadas con la sustancia gris periacueductal (SGP), región mesencefálica involucrada en la modulación cardiorrespiratoria y conductual ante determinados tipos de estrés así como en la actividad laríngea y la vocalización. También se ha demostrado cómo dichas estructuras pontinas están involucradas en los cambios del calibre laríngeo (Lara et al., 2002). El objetivo de este estudio es caracterizar por primera vez las relaciones entre los circuitos neuronales hipotalámicos y pontinos para comprender su papel en la actividad laríngea y su efecto en la vocalización.

Abstract

Stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area (DMH-PeF) in rats evokes a cardiorespiratory response characterised by an increase of blood pressure, heart rate and respiratory frequency. In certain studies (Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2018) has been shown a functional interaction between DMH-PeF and pontine structures (A5 Area and Parabrachial Complex), structures also connected with periaqueductal gray matter (SGP), a region involved in laryngeal activity modulation and vocalization. It has been also shown how rostral and ventral pontine structures are involved in the changes of laryngeal caliber (Lara et al., 2002). The aim of this study is to characterize for the first time the relations between hypothalamic and pontine neuronal circuits to understand their role in laryngeal activity and its effect on vocalization.

Introducción

Control central de la vocalización

La producción vocal es controlada a nivel central por una red neuronal compleja que parte de la corteza motora laríngea y desde la cual surgen proyecciones hacia la sustancia gris periacueductal (SGP) en el mesencéfalo, que activa regiones bulbotuberanciales: núcleo parabraquial medial - Kölliker-Fuse (PBm-KF); área 5 (A5); núcleo del tracto solitario (NTS); núcleo ambiguo (nA); y núcleo retroambiguo (nRA). En estas zonas se encuentran los generadores de patrones motores respiratorios y laríngeos, requeridos para una adecuada vocalización. Estas regiones bulbopontinas determinan el grado de intensidad y duración del sonido emitido (Holstege, 1989; Holstege, Kerstens, Moes y Vanderhorst, 1997; Ludlow, 2015) y controlan las motoneuronas laríngeas (Delgado-García, López-Barneo, Rial y González-Barón, 1982; Dawid-Milner, Lara, Milan y González-Barón, 1993), permitiendo así sincronizar los ciclos respiratorios con la actividad muscular laríngea, lo que supone, a su vez, la obtención de una presión subglótica bien controlada con niveles precisos de aire (Ludlow, 2015). Principalmente, es el nA el que modula la actividad de las motoneuronas laríngeas, orofaríngeas y craneofaciales involucradas en el habla (Pásaro, Lobera, González-Barón y Delgado-García, 1993; Ludlow, 2015).

La SGP recibe aferencias sensitivas procedentes de la corteza cingulada, del córtex prefrontal y de regiones límbicas, que aportan información auditiva, visual y somatosensorial necesaria para adaptar la respiración a las demandas que imponen el entorno (Holstege, 1989). Esto le permite modificar el patrón respiratorio porque hace posible determinar qué células de las regiones más bajas del tronco encefálico se excitarán para producir una acción motora coordinada (Jürgens y Pratt, 1979; Subramanian y Holstege, 2009). Así, la SGP participa en la iniciación e intensidad de la emisión vocal, pero no determina el patrón de respuestas ni su coordinación. De ello se encargan las regiones bulbotuberanciales ya comentadas (Esposito, Demeurisse, Alberti y Fabbro, 1999; Jürgens, 2009).

Hay estudios en ratas que describen proyecciones desde la SGP al nRA implicadas en la emisión vocal. Estos estudios sugieren que el nRA constituye un relé a través del cual la SGP excita motoneuronas musculares abdominales para la modificación de la presión abdominal. De esta manera, se consigue controlar tanto la inspiración como la espiración y adaptarlas a la vocalización (Holstege, 1989; Holstege et al., 1997). A partir del nRA, la SGP también modula las motoneuronas faríngeas y laríngeas localizadas en el nA (Boers, Klop, Hulshoff, De Weerd y Holstege, 1937) para activar los aductores laríngeos, tensar los pliegues vocales y aumentar la resistencia laríngea (Shiba, Umezaki, Zheng y Miller, 1997). La desinhibición de ambas zonas produce vocalización tanto en animales como humanos y lesiones en las mismas generan mutismo en el caso de SGP (Behbehani, 1995; Esposito et al., 1999; Jürgens, 2009) y un deterioro de la producción vocal en el caso del nRA (Shiba et al., 1997).

Reacción de defensa

La respuesta de defensa en animales empezó a estudiarse en 1935 por Kabat et al. Según estos autores, la estimulación eléctrica del Hipotálamo Caudal desencadena un patrón integrado de respuestas conductuales, neuroendocrinas y autonómicas, cuyos resultados coinciden con estudios realizados con posterioridad (Abrahams, Hilton y Zbrozyna, 1960; Yardley y Hilton, 1986; Markgraf et al., 1991; McDowall, Hourichi, Killinger y Dampney, 2006; Peinado-Aragonés, 2016).

Todo este patrón de respuestas autonómicas coincide en todos los mamíferos conscientes, incluido el humano, en situaciones que inducen estrés y amenaza, ya sea natural (Mancia y Zanchetti, 1981) o por un estímulo psicológico agudo como un chorro de aire o un ruido fuerte (Schadt y Hasser, 1998). Se sabe que son varios los núcleos del hipotálamo caudal que intervienen. Todos los núcleos que evocan respuestas cardiovasculares y autonómicas englobadas dentro de la reacción de defensa por estimulación eléctrica se incluyen dentro de la denominada *Área de Defensa Hipotalámica* (aDH) (Hilton, 1982).

En particular, la desinhibición de estas regiones, tanto en ratas anestesiadas como conscientes, produce aumentos de presión arterial y frecuencia cardíaca (Schadt y Hasser, 1988; McDowall et al., 2006), de la actividad frénica (PNA) y de la frecuencia respiratoria (Waldrop, Bauer y Iwamoto, 1988), vasodilatación muscular que permite la redistribución del flujo sanguíneo hacia el músculo esquelético de las extremidades posteriores (Eliasson, Folkow, Lindgren y Uvnas, 1951; Rosen, 1961; Dean y Coote, 1986; Yardley y Hilton, 1986) y aumentos en la actividad nerviosa simpática renal (RSNA). A estos cambios fisiológicos se le asocian también cambios en el control de la temperatura corporal, incrementos en la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (McDowall et al., 2006) y otros cambios autonómicos clásicos como piloerección, dilatación pupilar y movimientos de extremidades y cola (Abrahams et al., 1960). Con ello, el animal satisface las demandas de esfuerzo muscular y locomoción que le impone el estrés ambiental (Hilton, 1982; Yardley y Hilton, 1986).

Estos comportamientos son instintivos y entran en acción ante la presencia del estímulo idóneo. No obstante, el tipo de respuesta y los cambios hemodinámicos serán variables en función de las experiencias previas, de la percepción que el individuo tenga de la amenaza (Fernández-Molina, 1996) y de si se reacciona de manera activa (ataque/huida) o pasiva (inmovilidad/congelación) (Schadt y Hasser, 1998), lo que parece estar determinado por la especie (Markgraf et al., 1991). En concreto, el afrontamiento activo se asociaría a hipertensión, taquicardia y taquipnea, mientras que las estrategias de afrontamiento pasivo se asocian con un patrón conductual contrario, caracterizado por hipotensión, bradicardia y bradipnea (Bandler, Keay, Floyd y Price, 2000). Todos estos cambios fisiológicos permitirán al animal enfrentarse a una situación de estrés y responder las demandas fisiológicas de forma adecuada.

Los diversos estudios que han utilizado la estimulación eléctrica en ratas coinciden en que las regiones hipotalámicas implicadas principalmente en la reacción de defensa son: el Núcleo Dorsomedial Hipotalámico (nDMH) (Stotz-Potter, Morin y DiMicco, 1996; Fontes, Tagawa, Polson, Cavanagh y Dampney, 2001; McDowall et al., 2006), el Hipotálamo Lateral (LH) (Gebber y Klevans, 1972) y el Área Perifornical Hipotalámica (PeF) (Fernández-Molina, 1990; McDowall et al., 2006).

Durante mucho tiempo se ha cuestionado la fiabilidad de los estudios que han utilizado la técnica de estimulación eléctrica en la identificación de estas regiones cerebrales. Su desventaja es que la corriente eléctrica excita tanto los cuerpos celulares como los axones de paso, de tal manera que algunos autores sostienen que las respuestas defensivas evocadas por la estimulación de aDH pueden deberse a la despolarización de los axones de paso (Bandler, 1982; Tan y Dampney, 1983).

En contraposición, hay publicaciones que indican que la estimulación química del hipotálamo caudal mediante la microinyección del glutamato produce respuestas cardiorrespiratorias semejantes a las observadas durante la estimulación eléctrica de la misma zona. Dado que este aminoácido excitador no activa los axones de paso, se concluiría que las respuestas defensivas son consecuencia directa de la excitación de cuerpos celulares bien localizados dentro de aDH (Goodchild, Dampney y Bandler, 1982; DiMicco et al., 1986; Lipski, Bellingham, West y Pilowsky, 1988; Fontes et al., 2001; DiMicco, Samuels, Zaretskaia y Zaretsky, 2002; Cao, Fan y Morrinson, 2004; Horiuchi, McAllen, Killinger, Fontes y Dampney, 2004; McDowall et al., 2006).

Es posible que parte de la controversia existente entre los axones de paso y los cuerpos celulares tenga su respuesta en otros factores determinantes en estos estudios como el tipo y cantidad de anestesia inyectada, la concentración del neurotransmisor excitador empleado y la zona estimulada (Lipski et al., 1988).

Existen evidencias de que el DMH es el núcleo que desempeña el papel más crítico en la mediación de la reacción de defensa, huida y agresión (Fernández-Molina, 1996; McDowall et al., 2006). Su inhibición química conlleva una disminución importante de los aumentos de todos los cambios fisiológicos mencionados con anterioridad. Además, los estudios que usan marcador neuronal informan que la expresión de *c-fos* aumenta en DMH en situaciones de estrés (McDowall et al., 2006).

El DMH recibe múltiples aferencias de regiones del cerebro anterior, siendo de particular importancia las proyecciones procedentes del córtex prefrontal medial (CPF), para la transmisión del estrés emocional (Bernard y Bandler, 1998; Bandler et al., 2000; Bandler, Price, y Keay, 2000; Floyd, Price, Ferry, Keay y Bandler, 2000; 2001) y de la amígdala (Fontes et al., 2001). El núcleo basolateral (BLA) de la amígdala regula a las neuronas implicadas en la respuesta cardiovascular, evocada por la estimulación eléctrica del DMH (Soltis, Cook, Gregg, Stratton y Flickinger, 1998). Las conexiones directas existentes entre el DMH y los centros bulbares con control cardiovascular explican la capacidad moduladora de esta región hipotalámica sobre la presión arterial (Hardy, 2001; Horiuchi et al., 2004). Estas fibras eferentes convergen en el Bulbo Ventrolateral Rostral (BRVL) (Markgraf et al., 1991), centro vasopresor y, en el NTS, centro vasodepresor (Hardy, 2001; Horiuchi et al., 2004). De ahí, la dicotomía de efectos hemodinámicos (hipertensión o hipotensión) posibles. Ambas regiones mandan proyecciones eferentes excitadoras a neuronas preganglionares simpáticas, localizadas en la columna intermediolateral de la médula espinal (IML), que son las encargadas de los aumentos de presión arterial.

De acuerdo con diversos estudios anatómicos realizados, existe otra conexión hipotalámico-bulbar involucrada en el componente cardiovascular. Se trata de proyecciones descendentes desde el DMH hacia el Rafe Pálido (RP) (Samuels, Zaretsky y DiMicco, 2002; Zaretsky, Zaretskaia, Samuels, Cluxton y DiMicco, 2003; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004). En concreto, los estudios de marcaje retrógrado en el RP muestran que estas fibras simpatoexcitatorias surgen de una subregión específica del DMH conocida como *Área Dorsal Hipotalámica* (DA). En ella, se concentran neuronas sensibles a los aumentos de frecuencia cardíaca (Samuels, Zaretsky y DiMicco, 2004). La microinyección de muscimol (agonista de receptores GABA) en el RP conlleva una reducción sustancial de la taquicardia

(Zaretsky et al., 2003; Horiuchi et al., 2004; Samuels et al., 2004). El RP, a su vez, manda proyecciones a las neuronas preganglionares simpáticas que influyen en la frecuencia cardíaca localizadas en la médula espinal. Existen, por tanto, evidencias de que el DMH media las respuestas cardiovasculares a través de dos rutas descendentes que concluyen a nivel bulbar. Por un lado, las neuronas que proyectan hacia el BRVL, encargadas de los aumentos en la presión arterial y, por otro, proyecciones hacia el RP, encargadas del aumento de la frecuencia cardíaca (Samuel et al., 2002; Horiuchi et al., 2004; Samuel et al., 2004). Estos centros bulbares actuarían como efectores finales de la respuesta cardiovascular inducida por estímulos estresantes (Hardy, 2001).

Por otra parte, el DMH manda proyecciones hacia las neuronas que contienen la hormona liberadora de ACTH (CRH) localizadas en el Núcleo Paraventricular (PVN). Estas conexiones favorecen la secreción de ACTH, importante en la reacción de defensa (Stotz-Potter et al., 1996; Benarroch, 2005; De Menezes et al., 2009). Sin embargo, algunos datos sugieren que esta región no es, en su totalidad, dependiente del DMH, ya que parece ser que el PVN también participa en los cambios respiratorios y lo hace a través de proyecciones directas que se dirigen a los núcleos respiratorios bulbares y al núcleo frénico en la médula espinal (McDowall, Horiuchi y Dampney, 2007). Asimismo, estudios neuroanatómicos y electrofisiológicos han demostrado que esta región está conectada a otras áreas implicadas en el control cardiovascular como el BRVL. Esto explica la influencia que el PVN también tiene sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca (Martin y Haywood, 1993; Coote, Yang, Pyner y Deering, 1998).

Relación DMH y SGP

Diversos estudios han corroborado que la SGP además de la vocalización está implicada en la reacción de defensa y regulación autonómica (Hilton y Redfern, 1986; Yardley y Hilton, 1986; Bandler y Shipley, 1994; Peinado-Aragonés, 2016). La activación neural de esta región mesencefálica expresa conductas defensivas similares a las evocadas por la estimulación del DMH (López-González, 2013). La similitud en el patrón de respuestas cardiorrespiratorias parece residir en la interconexión entre el DMH y la SGP. Además, al igual que la SGP, el DMH recibe proyecciones aferentes importantes procedentes de la amígdala y del córtex prefrontal (CPF). Estas conexiones se han descrito tanto en ratas como primates. Todos los inputs recibidos por cada una de estas regiones evocan respuestas defensivas (Keay y Bandler, 2001).

En rata, los efectos autonómicos inducidos por el estrés ambiental están mediados por conexiones recíprocas entre la SGP y el DMH. Más concretamente, durante el estrés las neuronas localizadas en la región dorsolateral de la SGP activarían neuronas en el DMH que modificarían la actividad de centros autonómicos en el bulbo que generan un aumento de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca. Además, se ha demostrado que la actividad de la SGP dorsolateral depende de la integridad de neuronas del DMH. El aumento de la presión arterial y frecuencia cardíaca está mediada por conexiones existentes entre el DMH y el BVLR (De Menezes, Zaretsky, Fontes y DiMicco, 2009; Horiuchi, McDowall y Dampney, 2009).

Se han descrito proyecciones desde la SGP dorsolateral hacia regiones pontinas [Complejo Parabraquial (cPB) y A5]. Ambas regiones tienen proyecciones hacia el BVLR que facilitarían estos aumentos de la presión arterial (Farley, Barlow y Netsell, 1992; Lara et al., 2002).

Estudios realizados por el departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga corroboran la existencia de conexiones entre estas regiones hipotalámicas involucradas en la reacción de defensa (DMH - PeF), y centros cardiorrespiratorios pontinos como el A5 (López-González et al., 2013; Dawid-Milner, Lara, González-Barón y Spyer, 2001; Dawid-Milner, Lara, López-González, Spyer y González-Barón, 2003) y el cPB (Dawid-Milner et al., 2003; Díaz-Casares et al., 2009). Hay estudios que evidencian que el GABA y el glutamato son los neurotransmisores predominantes en el hipotálamo e interactúan entre sí para modular la actividad neural de dicha región (Soltis y DiMicco, 1991). Además, los datos aportados por este grupo investigador sugieren que el glutamato podría constituir el neurotransmisor principal de las conexiones entre el DMH y el PeF y entre el cPB y el A5 (Díaz-Casares, López-González, Peinado-Aragonés, González-Barón y Dawid-Milner, 2012; López-González et al., 2018).

Por todo lo anteriormente descrito se puede afirmar que la reacción de defensa precisa para su inicio y organización de la actividad integrada de DMH y SGP, regiones que están interconectadas funcionalmente y que, a su vez, comparten directa e indirectamente conexiones con estructuras bulbopontinas (Hilton, 1982; Yardley y Hilton, 1986).

Objetivos

Los trabajos del grupo de investigación del Departamento de Fisiología de la UMA han descrito la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA y los mecanismos reflejos implicados en las respuestas laringo-respiratorias (Dawid- Milner, Lara, Milan y González-Barón, 1993), así como han descrito una red de núcleos hipotálamo-mesencéfalo-bulboprotuberanciales que modulan las respuestas cardiorespiratorias producidas por determinados tipos de estrés (Díaz-Casares, 2009, 2012; López-González, 2013, 2018).

Actualmente se piensa que la SGP puede tener una función importante en el control de la vocalización debido a sus conexiones funcionales bulboprotuberanciales. Como se ha demostrado que parte de su actividad está modulada por el DMH – PeF esto da pie a pensar que esta zona hipotalámica puede estar involucrada en este control. Sin embargo, existe un número reducido de estudios centrados en dilucidar el papel de estos circuitos en el control laríngeo.

Por todo ello, desde el Departamento de Fisiología Humana de la Universidad de Málaga, se lleva tiempo intentando clarificar el papel que desempeñan las diferentes estructuras hipotalámicas antes mencionadas en el control de la actividad laríngea a través de los estudios de presión subglótica. En concreto, se pretende describir el papel que tienen núcleos supraencefálicos como el DMH - PeF en el control de la actividad laríngea. Con los resultados de este estudio se podría obtener una mayor comprensión de los mecanismos neurofisiológicos de los circuitos neuronales hipotálamo – mesencéfalo – bulboprotuberanciales implicados en dicha función y, consecuentemente, una nueva forma de ver las fisiopatologías del control laríngeo. A su vez, este estudio abre una nueva línea de investigación en el campo de la Logopedia.

El objetivo general de este estudio es describir estos circuitos neuronales implicados en la vocalización a través de la estimulación eléctrica del DMH – PeF, encargados de modular las motoneuronas laríngeas del nA. Se utilizará técnicas de registro indirecto de la actividad laríngea y parámetros cardiorespiratorios característicos de la reacción de defensa.

Se plantea el siguiente objetivo específico:

1. Registrar y estudiar, en rata, la variable presión subglótica evocada por la estimulación eléctrica del DMH - PeF antes (reposo), durante y después (vuelta al reposo) de dicha estimulación junto con los parámetros fisiológicos típicos de la reacción de defensa (presión arterial, presión pleural, flujo respiratorio, frecuencia respiratoria instantánea y frecuencia cardíaca instantánea). Todas estas variables también se registrarán antes, durante y después de la estimulación eléctrica del DMH - PeF.

Método

Animal de experimentación

Este estudio se ha realizado en 3 ratas macho no consanguíneas SPF (Specific-pathogen-free) de tipo Sprague-Dawley con un peso entre los 300 y 400 g. Dichos animales han sido proporcionados por la casa CRIFFA y estabulados un mínimo de dos semanas en el Centro de Investigación Animal de la Universidad de Málaga en la Facultad de Medicina. Durante su estancia en el estabulario, las condiciones climáticas y lumínicas han sido controladas en todo momento: temperatura media de $21 \pm 1^\circ \text{C}$ y 12 horas de luz y otras 12 horas de oscuridad. La alimentación se ha basado en una dieta estándar para animales experimentales (A04 Panlab) y agua descalcificada.

Acuerdo y compromiso ético

Todo el proceso experimental se ha realizado respetando la normativa establecida por la directiva (2010/63/EU) de la Unión Europea tal y como se establece en el Art. 34 del RD 53/2013 del 1 de febrero, que determina las normas básicas aplicables para la protección de animales experimentales, ya sea para fines científicos o docentes.

Se ha intentado experimentar con el menor número posible de animales, lo suficiente como para obtener resultados fidedignos. Al mismo tiempo, se ha intentado disminuir el sufrimiento y estrés experimental. Todo ello, ha sido aprobado tanto por el Comité Ético para Experimentación Animal de la Universidad de Málaga (Anexo 1) como por la Junta de Andalucía (Anexo 2).

Procedimiento quirúrgico

1. Anestesia del animal

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg). Para la dosis de ataque se inyectó, por vía intraperitoneal, 0.1 mL por cada 100 g. del peso animal. Durante el experimento, se inyectaron dosis de mantenimiento de pentobarbital sódico al 20% de la dosis de ataque. Estas dosis

adicionales se administraron por vía intravenosa de 0.1 mL en 0.1 mL. La estabilidad/inestabilidad de las variables *presión sanguínea*, *frecuencia cardíaca* y *actividad respiratoria* tras el pinzamiento de las extremidades posteriores se tomaron como referentes para determinar el nivel de anestesia y, por ende, la necesidad o no de administrar la dosis de mantenimiento.

2. *Rasurado del animal*

Con una esquiladora eléctrica se rasuró el triángulo de Scarpa en la extremidad trasera izquierda, la zona cervical anterior y la región parieto-occipital para facilitar el proceso quirúrgico.

3. *Canulación vena y arteria femorales*

Se realizó una incisión cutánea sobre la zona del triángulo de Scarpa para dejar al descubierto la vena y arteria femorales para su canulación. A través de la vena femoral se administraba las dosis de mantenimiento de Pentobarbital y suero salino. La cánula de la arteria femoral permitió la medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca y la inyección de suero heparinizado (ver imagen 1).

4. *Aislamiento del nervio laríngeo recurrente y vago*

Se realizó una incisión cutánea en la zona cervical anterior para la posterior canulación de la tráquea y el esófago distal. La incisión se realizó en dirección caudal desde el segundo anillo traqueal hacia la inserción de los músculos esternocleidomastoideos. Para mayor visualización de la tráquea extratorácica, se realizó una disección roma en el músculo platisma y el músculo largo del cuello.

Se localizaron los nervios laríngeos recurrentes y vago (par X) y se asilaron *in situ* a nivel del tercio medial de la tráquea extratorácica (ver imagen 2). Durante todo el procedimiento se dispuso de una lupa quirúrgica y unas pinzas de microcirugía para reducir significativamente la probabilidad de que los nervios se lesionasen o se produjese la rotura de la arteria carótida primitiva, ligeramente adyacente a dichos nervios.

5. *Traqueotomía, canulación traqueal y aislamiento de glotis*

Se practicaron dos incisiones longitudinales de 0.2 cm de longitud en la tráquea con un termobisturí y se introdujeron dos cánulas, una en dirección caudal y otra en dirección rostral (ver imagen 3). Por la cánula rostral en dirección a la laringe se introducía un flujo constante de aire artificial húmedo y caliente (36-37 °C). La cánula caudal se conectó a un neumotacógrafo para registrar y medir el flujo respiratorio. Esta técnica de glotis aislada *in situ* permite el registro de la presión subglótica, sin interferencia del flujo respiratorio.

6. *Canulación esofágica*

Se aisló el esófago de la tráquea y sobre él se realizó una incisión longitudinal con un termobisturí para introducir una cánula de propileno con aire en su interior para el registro indirecto de la presión pleural a partir de la medición de la presión esofágica. La cánula se introdujo en dirección caudal, quedando ligeramente por encima del esternón (ver imagen 3).

7. *Parietostomía bilateral posterior*

Concluidas las fases anteriores y con la región parieto-occipital rasurada, se colocó el animal, en posición de decúbito prono, sobre un aparato de estereotaxia (Kopf Instrument) y se fijó a tres niveles diferentes, a nivel de los conductos auditivos externos, boca y hocico (ver imagen 4).

Se practicó una incisión cutánea longitudinal sobre la cabeza para la visualización de la bóveda craneal y, *a posteriori*, se realizó una parietostomía bilateral de 4 mm de diámetro en las coordenadas 2.3 mm posterior a bregma y 0.6 mm lateral a la línea media para la posterior estimulación eléctrica de DMH – PeF (Paxinos y Watson, 1997) (ver imagen 5).

Durante todo el proceso se aseguró una temperatura corporal idónea en el animal (37 ± 0.5 °C), regulada por un sistema de manta termostática homeotérmica y controlada por una sonda rectal. Además, se fijó la lengua del animal para evitar que durante la estimulación eléctrica posterior se produjera una retracción y aumentara la presión intraoral.

Imagen 1
Canulación vena y arteria femorales

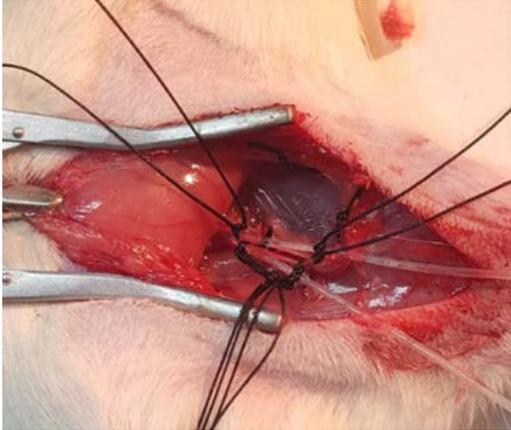


Imagen 2
Aislamiento de los nervios laríngeos

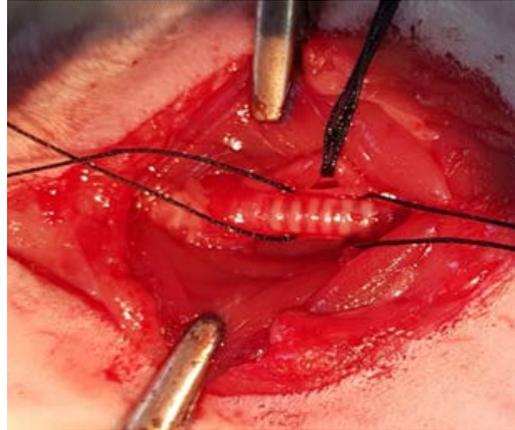


Imagen 3
Canulación traqueal, subglótica y esofágica

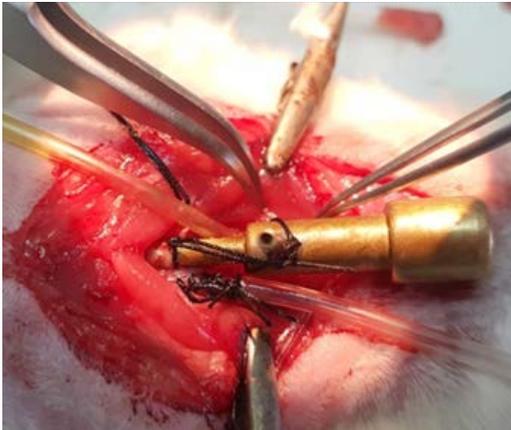


Imagen 4
Posición y fijación del animal en el aparato de estereotaxia



Imagen 5
Incisión cutánea longitudinal sobre la cabeza y parietostomía



Estimulación eléctrica de DMH – PeF

Se situó estereotáxicamente un microelectrodo concéntrico bipolar (SNE 100, RODHES Medical Electrodes) a 2.3 mm posterior a bregma, 0.6 mm lateral a la línea media y a una profundidad de 7 mm en relación a la superficie cerebral (Paxinos y Watson, 1997) para la estimulación eléctrica de DMH – PeF.

Se estimuló eléctricamente con pulsos de 1 ms durante 5 s (100 Hz) a una intensidad de 20 – 40 μ A y se procedió al estudio pre, peri y post-estimulación de las variables medidas y registradas por el software LabChartPro y hardware PowerLab.

Las variables cardiovasculares y respiratorias se tomaron como referentes para asegurar que la región objeto de estudio estaba siendo estimulada eléctricamente. Más concretamente, se comprobaba que las respuestas eran típicas de la reacción de defensa de DMH – PeF.

VARIABLES REGISTRADAS

En este estudio se han registrado las siguientes variables:

- Presión arterial
- Presión pleural
- Flujo respiratorio
- Presión subglótica
- Frecuencia respiratoria instantánea
- Frecuencia cardíaca instantánea

Estas variables se medirán 5 segundos antes de la estimulación, durante la estimulación y 20 segundos después de la estimulación. Sólo se valorarán los datos obtenidos en las experiencias en las que el estudio histológico demuestre que las distintas estimulaciones fueron realizadas en el DMH – PeF.

MATERIAL TÉCNICO EMPLEADO PARA EL REGISTRO DE LAS VARIABLES

Amplificadores. Se utilizaron amplificadores de tipo S72-25 de la casa Coulbourn Instruments para el registro de las variables presión pleural, presión arterial y flujo respiratorio (voltaje máximo de entrada de 10mV, resistencia de entrada de 10^{10} Ω e impedancia de salida de 50 Ω).

Báscula de peso animal. Permitted obtener el peso en gramos de cada una de las ratas de la experimentación.

Convertidor analógico / digital. Sistema multiplexado con 8 canales para la digitalización de una señal analógica. Se utilizó el modelo PowerLab de la marca ADInstruments.

Electrodos de estimulación concéntricos bipolares. Modelo empleado SNE 100 DE Rhodes Medical Electrodes. Permitted la microestimulación eléctrica de la región cerebral de interés.

Generador de onda cuadrada. Constituyó la fuente de impulsos de la corriente eléctrica transmitida a través de los microelectrodos para la estimulación. Se utilizó el modelo CS-220^a de Cibertec.

LabChartPro. Software de ADInstruments que permitió el registro y análisis de las variables presión subglótica, presión arterial, presión pleural, flujo respiratorio, frecuencia respiratoria instantánea y frecuencia cardíaca instantánea antes, durante y después de la estimulación.

Mesa antivibratoria de gas. Modelo TMC sys 63530 con una superficie de trabajo ferromagnética de acero inoxidable. Permitted aislar la zona experimental de las vibraciones externas.

Microscopio quirúrgico. El modelo utilizado fue Leica M-300. Este permitió visualizar tanto el campo quirúrgico como el campo de registro electrofisiológico.

Neumotacógrafo. Contaba con un tubo rígido conectado a la cánula traqueal para el registro del flujo respiratorio. En particular, permitió el registro del gradiente de presión, equiparable al flujo de aire, mediante la conexión del neumotacógrafo a un transductor de presión diferencial.

Con el registro se obtuvo el neumotacograma, que representaba las variaciones cíclicas de las fases respiratorias. En ella, se distinguía dos puntos de flujo cero, una al final de la inspiración y la restante al final de la espiración y dos puntos de flujo máximo, uno relativo al flujo máximo inspiratorio y el otro relativo al flujo máximo de espiración. El flujo instantáneo se pudo observar en cualquier momento del ciclo. Se utilizó el modelo Fleish (00), caracterizado por tener una sensibilidad de 11.25 ml/s.

Osciloscopio digital. Para la digitalización de las señales analógicas, el cálculo de las dimensiones y la exportación de dichos datos a un plotter. Además permitió la visualización simultánea de dos canales, el flujo y presión pleural. El modelo empleado fue VC-6023 de Hitachi.

Panel de conexiones múltiples. Estructura metálica con un total de 28 entradas intercambiables y 45 salidas que permitió interconectar los diferentes equipos. Diseñado por Marc Stefan David Milner y fabricado por Álava Ingenieros.

Tacómetro. Se utilizó el modelo S77-26 de Coulbourn Instruments. Permitió el registro de la frecuencia cardíaca instantánea a partir de la conversión del intervalo interlatido en un valor de voltaje de salida equiparable al valor de entrada. La señal de entrada se obtuvo por medio del registro de la presión arterial.

Transductor de presión. Se utilizaron tres modelos distintos para la medición de tres variables bien diferenciadas. Se utilizó un transductor de presión aneroide, tipo T41-05, de la casa Coulbourn Instruments para medir la presión pleural, valorada indirectamente a través de la presión esofágica. Para la variable flujo respiratorio se empleó un transductor de presión diferencial, modelo SP-20140D. Por su parte, la variable presión arterial el modelo elegido fue el MP-15D, también de la casa Coulbourn Instruments, con una sensibilidad de 50 mV/V/cmHg.

Torreta de estereotaxia. Se utilizó el modelo SM-11 de Narishige. Posibilitó la microestimulación de la región de interés (DMH – PeF).

Unidad de aislamiento. Eliminó interferencias en las señales registradas. Permitió realizar la estimulación eléctrica libre de interferencias en las señales registradas. El modelo empleado fue el 100 de Cibertec.

Extracción encefálica y proceso histológico

Tras finalizar los experimentos, se inyectó por vía intravenosa una cantidad suficiente de pentobarbital sódico (4 mg/Kg) para inducir parada cardiorrespiratoria en el animal y proceder a la extracción del encéfalo. Las lesiones eléctricas, producidas por el electrodo de estimulación asegurarán que la posición del electrodo es correcta (DMH - PeF).

Para la extracción del encéfalo se realizó una transección medular entre los límites bulboespinal y medio colicular. Se introdujo el encéfalo en una solución de formol 50 ml al 5%. Se cortará en secciones de 80 μ m, con criotomo (Leica Instruments GmbH, Mod.1206). Los cortes obtenidos serán posteriormente teñidos con rojo neutro.

Resultados

1. Primer experimento

En el primer experimento (peso del animal 305 g.) se intentó hacer un primer ajuste de las dosis de anestésico, tanto de ataque como de mantenimiento. La dosis de ataque (60 mg/kg) se administró vía intraperitoneal (0.1 ml de anestésico por cada 100 g de peso) y la dosis de mantenimiento por vía intravenosa (pentotal al 20% de la dosis de ataque). Además, se hizo también una aproximación a las técnicas quirúrgicas necesarias para el desarrollo del estudio.

2. Segundo experimento

En el segundo experimento (peso animal 330 g.) se certificó que las dosis de anestésico escogidas en el anterior eran correctas, además se inició una segunda aproximación a las técnicas quirúrgicas, sobre todo a la fase de la técnica de aislamiento de la glotis in situ, la cual permite la medición de la presión subglótica.

También se hizo una primera aproximación a la fase de estereotaxia que permitió calibrar el software de recogida y proceso de datos (LabChartPro) de reciente adquisición por el Departamento de Fisiología Humana de la UMA. Con este software se pueden registrar y analizar todos los parámetros cardiorrespiratorios del animal (presión arterial, presión pleural, flujo respiratorio, frecuencia respiratoria instantánea y frecuencia cardíaca instantánea) y presión subglótica.

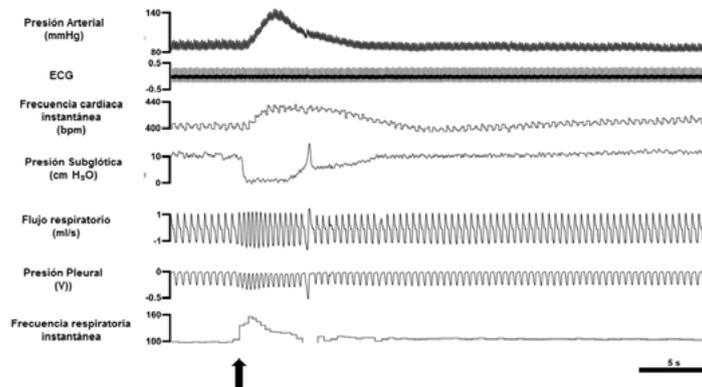
3. Tercer experimento

Superadas las fases de elección de las dosis de anestésico, quirúrgica y de registro y medición de variables, el tercer experimento permitió una aproximación a las técnicas neuroquirúrgicas de localización y estimulación de los centros cerebrales a estudiar (DMH). Además, se analizaron y estudiaron todas las variables, en especial la variable presión subglótica, antes, durante y después de la estimulación eléctrica de esta región hipotalámica.

De manera más concreta, se colocó al animal (395 g. de peso) en el aparato de estereotaxia. Con las torres del equipo de estereotaxia colocadas en posición de la localización espacial de la zona de estudio (2,3 posterior a Bregma y 0,6 lateral derecho a la línea media), se fue bajando verticalmente el electrodo hasta los 7 mm de profundidad, a partir de los cuales se fue estimulando eléctricamente (20-40 μ A, a 100 Hz, pulsos de 1 ms, durante 5 s) de 0,1 mm en 0,1 mm hasta encontrar la posición exacta donde se generaba la respuesta de defensa característica del DMH (hipertensión, taquicardia y taquipnea). Se mantuvo la lengua del animal fijada para evitar cambios de presión intraoral que afectasen a la medición de la presión subglótica. El análisis de los cambios de la presión subglótica permitió observar que durante la estimulación de esta región hipotalámica, bajo estas condiciones, se genera una disminución de la presión subglótica (ver figura 1).

Figura 1

Cambios cardiorespiratorios durante la microestimulación eléctrica del DMH-PeF (flecha vertical hacia arriba). La microestimulación eléctrica tiene una duración de cinco segundos. Se representan de arriba hacia abajo los registros de presión arterial, ECG, presión subglótica, flujo respiratorio, presión pleural, frecuencia respiratoria instantánea y frecuencia cardíaca instantánea.



Discusión y conclusiones

Este estudio constituye el inicio de la implementación de un diseño experimental anterior encabezado por el Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina en la Universidad de Málaga (González-García, 2017). Estos primeros resultados dan pie a pensar que dicho diseño es correcto y que es posible su implementación. Más concretamente, los datos de este estudio sugieren que el DMH - PeF modula la actividad de las motoneuronas laríngeas ubicadas en el nA, ya que se producen cambios de presión subglótica tras la estimulación de dicha zona hipotalámica. Por tanto, se podría añadir una función más, control de la vocalización a las ya conocidas, centradas en el control cardiorespiratorio bajo situaciones de estrés. No obstante, no cabe duda que es necesario realizar un mayor número de experimentos que permitan perfeccionar la técnica y aumentar los datos que aseguren que el DMH está implicado en la vocalización.

Conclusiones específicas:

- I. El uso de Pentobarbital sódico como anestésico tanto para la dosis de ataque como de mantenimiento permite obtener resultados y mediciones de los parámetros cardiorespiratorios de manera fiable.
- II. La técnica quirúrgica de glotis aislada in situ es apropiada para la obtención y medición de la variable presión subglótica.
- III. La retracción de la lengua no es la responsable de los cambios producidos en la variable de presión subglótica.
- IV. Es necesario aumentar el número experimentos que permitan obtener datos suficientes estadísticamente significativos que permitan aumentar y/o generar nuevos conocimientos teóricos acerca de la implicación del DMH en el control de la actividad laríngea y en el proceso de vocalización.

Referencias

- Abrahams, C.V., Hilton, S.M. & Zbrozyna, A.W. (1960). Active muscle vasodilation produced by stimulation of the brainstem: its significance in the defence reaction. *J Physiol*, 154, 491-513.
- Bandler, R. (1982). Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neurosci Lett*, 30(2), 183-188. doi: 10.1016/0304-3940(82)90294-4
- Bandler, R., & Shipley, M. T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neurosciences*, 17(9), 379-389. doi: 10.1016/0166-2236(94)90047-7
- Bandler, R., Keay, K.A., Floyd, N. & Price, J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull*, 53(1), 95-104.
- Bandler, R., Price, J.L. & Keay, K.A. (2000). Brain mediation of active and passive emotional coping. *Prog Brain Res*, 122, 333-349. doi:10.1016/s0079-6123(08)62149-4
- Behbehani, M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol*, 46(6), 575-605. doi:10.1016/0301-0082(95)00009-k
- Benarroch, E.E. (2005). Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin Auton Res*, 15(4), 254-263. doi:10.1007/s10286-005-0290-7

- Bernard, J.F. & Bandler, R. (1998). Parallel circuits for emotional coping behaviour: new pieces in the puzzle. *J Comp Neurol*, 401(4), 429-436.
- Boers, J., Klop, E.M., Hulshoff, A.C., De Weerd, H. & Holstege, G. (1937). Direct projections from the nucleus retroambiguus to cricothyroid motoneurons in the cat. *J Neurosci*, 319(1), 5-8. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02395-3
- Cao, W.H., Fan, W. & Morrison, S.F. (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*, 126(1), 229-240. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.013
- Coote, J.H., Yang, Z., Pyner, S. & Deering, J. (1998). Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 25(6), 461-463. doi:10.1111/j.1440-1681.1998.tb02235.x
- Dawid-Milner, M.S., Lara, J.P., Milan, A. & González-Barón, S. (1993). Activity of inspiratory neurones of the ambiguous complex during cough in the spontaneously breathing decerebrate cat. *Exp Physiol*, 78(6), 835-838. doi:10.1113/expphysiol.1993.sp003730
- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., González-Barón, S., & Spyer, K. M. (2001). Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetized rat. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, 441(4), 434-443. doi: 10.1007/s004240000450
- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., López de Miguel, M. P., López-González, M. V., Spyer, K. M., & González-Barón, S. (2003). A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetized rat. *Brain Res*, 982(1), 108-118. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03005-1
- Dean, C. & Coote, J.H. (1986). Discharge patterns in postganglionic neurones to skeletal muscle and kidney during activation of the hypothalamic and midbrain defence areas in the cat. *Brain Res*, 377(2), 271-278. doi: 10.1016/0006-8993(86)90868-1
- De Menezes, R. C. A., Zaretsky, D. V., Fontes, M. A. P., & DiMicco, J. A. (2009). Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol*, 587(6), 1201-1215. doi:10.1113/jphysiol.2008.161463
- Delgado-García, J.M., López-Barneo, J., Rial, R. & González-Barón, S. (1982). Estudio de la actividad funcional de las motoneuronas laríngeas en el gato anestesiado. *Rev Esp Fisiol*, 28, 375-382.
- Díaz-Casares, A., López-González, M.V., Peinado-Aragonés, C.A., Lara, J.P., González-Barón, S. & Dawid-Milner, M.S. (2009). Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area stimulation in the anesthetized rat. *Brain Res*, 1279, 58-70. doi:10.1016/j.brainres.2009.02.085
- Díaz-Casares, A., López-González, M.V., Peinado-Aragonés, C.A., González-Barón, S. & Dawid-Milner, M.S. (2012). Parabrachial complex glutamate receptors modulate the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area. *Autonomic Neuroscience*, 169 (2), 124-134. doi:10.1016/j.autneu.2012.06.001
- DiMicco, J.A., Abshire, V.M., Hankins, K.D., Sample, R.H.B. & Wible, J.H. (1986). Microinjection of GABA antagonist into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology*, 25(9), 1063-1066. Doi: 10.1016/0028-3908(86)90203-0
- DiMicco, J.A., Samuels, B.C., Zaretskaia, M.V. & Zaretsky, D.V. (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(3), 496-480. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00689-x
- Eliasson, S., Folkow, B., Lindgren, P. & Uvnas, B. (1951). Activation of sympathetics vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. *Acta Physiol Scand*, 23(4), 333-351. doi: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00819.x
- Esposito, A., Demeurisse, G., Alberti, B. & Fabbro, F. (1999). Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. *Neuroreport*, 10(4), 681-685. doi: 10.1097/00001756-199903170-00004
- Farley, G.R., Barlow, S.M. & Netsell, R. (1992). Factors influencing neural activity in parabrachial regions during cat vocalizations. *Exp Brain Res*, 89(2), 341-351. doi: 10.1007/bf00228250
- Fernández-Molina, A. (1996). Los comportamientos de defensa, huida y agresión. En Botella-Llusiá, J. y Tresguerres, J.A.F. (Ed). *Hormonas, instintos y emociones* (pp.129-145). Madrid, España: Editorial Complutense.
- Floyd, N.S., Price, J.L., Ferry, A.T., Keay, K.A. & Bandler, R. (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol*, 422(4), 556-578. doi:10.1002/1096-9861(20000710)422:4<556::aid-cne6>3.0.co;2-u
- Floyd, N.S., Price, J.L., Ferry, A.T., Keay, K.A. & Bandler, R. (2001). Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*, 432(3), 307-328. doi:10.1002/cne.1105

- Fontes, M.A.P., Tagawa T., Polson, J.W., Cavanagh, S.J. & Dampney, R.A.L. (2001). Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am Physiol*, 208, H2891-H2901. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.h2891
- Gebber, G.L. & Klevans, L.R. (1972). Central nervous modulation of cardiovascular reflexes. *Fed Proc*, 31, 1245-1252.
- González-García, M. (2017). Diseño de estudio electrofisiológico de mecanismos supraencefálicos implicados en el control de la actividad laríngea (Trabajo de Fin de Máster). Universidad de Málaga, Málaga.
- Goodchild, A.K., Dampney, R.A.L. & Bandler, R. (1982). A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not of passage, within a localized region of the central nervous system. *J Neurosci Methods*, 6(4), 351-363. doi: 10.1016/0165-0270(82)90036-X
- Hardy, S. G. P. (2001). Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. *Brain Research*, 894(2), 233-240. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02053-4
- Hilton, S.M. (1982). The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol*, 100, 159-174.
- Hilton, S.M. & Redfern, W.S. (1986). A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J Physiol*, 378(1), 213-228. doi:10.1113/jphysiol.1986.sp016215
- Holstege, G. (1989). Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol*, 284(2), 242-252. doi:10.1002/cne.902840208
- Holstege, G., Kerstens, L., Moes, M.C. & Vanderhorst, V.G. (1997). Evidence for a periaqueductal gray-nucleus retroambiguus-spinal cord pathway in the rat. *Neuroscience*, 80(2), 587-598. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00061-4
- Horiuchi, J., McAllen, A.M., Killinger, S., Fontes, M.A. & Dampney, R.A. (2004). Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(4), R824-R832. doi: 10.1152/ajpregu.00221.2004
- Horiuchi, J., McDowall, L. M., & Dampney, R. A. L. (2009). Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *The Journal of Physiology*, 587(21), 5149-5162. doi:10.1113/jphysiol.2009.179739
- Jürgens, U., & Pratt, R. (1979). Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. *Brain Research*, 167(2), 367-378. doi:10.1016/0006-8993(79)90830-8
- Jürgens, U. (2009). The Neural Control of Vocalization in Mammals: A Review. *J Voice*, 23(1), 1-10. doi:10.1016/j.jvoice.2007.07.005
- Kabat, H., Magoun, H.W. & Ranson, S.W. (1935). Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain: The resultant alterations in blood pressure. *Arch Neurol Psychol*, 34(5), 931-955. doi:10.1001/archneurpsyc.1935.0225023
- Keay, K.A. & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(7-8), 669-678. doi: 10.1016/s0149-7634(01)00049-5
- Lara, J.P., Dawid-Milner, M.S., López, M.V., Montes, C., Spyer, K.M. & González-Baron, S. (2002). Laryngeal effects of stimulation of rostral and ventral pons in the anaesthetized rat. *Brain Res*, 934(2):97-106. doi: 10.1016/s0006-8993(02)02364-8
- Lipski, J., Bellingham, M. C., West, M. J., & Pilowsky, P. (1988). Limitations of the technique of pressure microinjection of excitatory amino acids for evoking responses from localized regions of the CNS. *Journal of Neuroscience Methods*, 26(2), 169-179. doi: 10.1016/0165-0270(88)90166-5
- López-González, M. V., Díaz-Casares, A., Peinado-Aragonés, C. A., Lara, J. P., Barbancho, M. A., & Dawid-Milner, M. S. (2013). Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetized rats. *Exp Physiol*, 98(8), 1279-1294. doi:10.1113/expphysiol.2013.072538
- López-González, M.V., Díaz-Casares, A., González-García, M., Barbancho, M.A., Carrillo-Albornoz, M. & Dawid-Milner, M.S. (2018). Glutamate receptors of the A5 region modulate cardiovascular responses evoked from the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *J Physiol Biochem*, 74(2):325-334. doi: 10.1007/s13105-018-0623-3
- Ludlow, C.L. (2015). Central nervous system control of interactions between vocalization and respiration in mammals. *J Clin Neurophysiol*, 32(4), 294-303. doi:10.1002/hed.21904
- Mancia, G. & Zanchetti, A. (1981). Hypothalamic control of autonomic functions. *Handbook of the Hypothalamus, Vol3, Part B, Behavioral Studies of the Hypothalamus ed. Morgane PJ and Panksepp j*, 147-201.
- Markgraf, C.G., Winters, R.W., Liskowsky, D.R., McCabe, P.M., Green, E.J. & Schneiderman, N. (1991). Hypothalamic, midbrain and bulbar areas involved in the defense reaction in rabbits. *Physiol Behav*, 49 (3), 493-500. doi: 10.1016/0031-9384(91)90270-x

- Martin, D.S. & Haywood, J.R. (1993). Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats. *Am J Physiol*, 265(5), H1727-1733. doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.5.H1727
- McDowall, L.M., Horiuchi, J., Killinger, S. & Dampney, R.A. (2006). Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(4), R1020-R1026. doi:10.1152/ajpregu.00541.2005
- McDowall, L. M., Horiuchi, J., & Dampney, R. A. L. (2007). Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(4), R1728-R1735. doi:10.1152/ajpregu.00503.2007
- Pásaro, R., Lobera, B., González-Barón, S. & Delgado-García, J.M. (1983). Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat. *Exp Neurol*, 82(3), 623-634. doi: 10.1016/0014-4886(83)90085-7
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press.
- Peinado-Aragonés, C.A. (2016). *Interrelaciones de la sustancia gris periacueductal dorsolateral y la región protuberancial a5 en el control central cardiorrespiratorio* (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, Málaga.
- Rosen, A. (1961). Augmented cardiac contraction, heart rate acceleration and skeletal muscle vasodilation produced by hypothalamic stimulation in the cat. *Acta Physiol Scand*, 52(3-4), 291-308. doi: 10.1111/j.1748-1716.1961.tb02226.x
- Samuels, B. C., Zaretsky, D. V., & DiMicco, J. A. (2002). Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *The Journal of Physiology*, 538(3), 941-946. doi:10.1113/jphysiol.2001.013302
- Samuels, B. C., Zaretsky, D. V. & DiMicco, J. A. (2004). Dorsomedial hypothalamic sites where disinhibition evokes tachycardia correlate with location of raphe-projecting neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(2), R472-R478. doi:10.1152/ajpregu.00667.2003
- Schadt, J.C. & Hasser, E.M. (1998). Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 274(3 Pt 2), R814-R821. doi:10.1152/ajpregu.1998.274.3.r814
- Shiba, K., Umezaki, T., Zheng, Y. & Miller, A.D. (1997). The nucleus retroambiguus controls laryngeal muscle activity during vocalization in the cat. *Exp. Brain Res*, 115(3), 513-519. doi: 10.1007/pl00005721
- Soltis, R. P., & DiMicco, J. A. (1991). Interaction of hypothalamic GABA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 261(2), R427-R433. doi:10.1152/ajpregu.1991.261.2.r427
- Soltis, R.P., Cook, J.C., Gregg, A.E., Stratton, J.M. & Flickinger, K.A. (1998). EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate in the cardiovascular response to activation of the amygdala. *Am Physiol*, 275(2), R624-R631.
- Stotz-Potter, E.H., Morin, S.M. & DiMicco, A. (1996). Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res*, 742(1-2), 219-224. doi: 10.1016/s0006-8993(96)01011-6
- Subramanian, H.H. & Holstege, G. (2009). The nucleus retroambiguus control of respiration. *J Neurosci*, 29(12), 3824-3832. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009.
- Tan, E. & Dampney, R.A.L. (1983). Cardiovascular effects of stimulation of neurons within the 'defence area' of the hypothalamus and midbrain of rabbits. *Clin Exp Pharm Physiol*, 10(3), 299-303. doi:10.1111/j.1440-1681.1983.tb00201.x
- Yardley, C.P. & Hilton, S.M. (1986). The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv System*, 15(3), 227-244. doi: 10.1016/0165-1838(86)90066-4
- Waldrop, T.G., Bauer, R.M. & Iwamoto, G.A. (1988). Microinjection of GABA antagonist into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation. *Brain Res*, 444(1), 84-94. doi: 10.1016/0006-8993(88)90916-x
- Zaretsky, D. V., Zaretskaia, M. V., Samuels, B. C., Cluxton, L. K., & DiMicco, J. A. (2003). Microinjection of muscimol into raphe pallidus suppresses tachycardia associated with air stress in conscious rats. *The Journal of Physiology*, 546(1), 243-250. doi:10.1113/jphysiol.2002.032201

Anexos

Anexo 1

Permiso del comité ético para la experimentación animal en la UMA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado de Investigación y Transferencia
Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga
(CEUMA)

INFORME Nº: 42 ANEXO VIII

INFORME DEL ORGANISMO HABILITADO (Art. 34 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)

D. Ricardo González Carrascosa Latín, como Secretario del Órgano Habilitado Comité Ético de Experimentación Animal de Universidad de Málaga

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (Título del proyecto):

Investigación en el Control Nervioso de la Respiración, Circulación y Emociones.

2. Que tiene una duración de:

5 Años
60 Meses

3. Que está realizado por (Datos del investigador principal o persona responsable):

Apellidos: Marck Stefan
Nombre: Dawid-Milner
Categoría (s) (según RD 1201/2005): C, D1
Fecha acreditación C, D1 (21/06/2006)
Centro/Facultad/Empresa, Dpto., Dirección, Código Postal, Ciudad, Teléfono, Fax, E-Mail
Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología Humana.
Campus de Teatinos s/n
29080 Málaga. MÁLAGA
Telf.: 952131577
Fax.: 952131650
Correo E.: msdawid@uma.es



Pabellón de Gobierno, planta 3ª. Campus El Ejido. 29071. Tel.: 952 13 42 14
E-mail: ceuma@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado de Investigación y Transferencia
Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga
(C.F.U.M.A)

INFORME Nº: 42

4. Que ha sido evaluado con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los siguientes requisitos de acuerdo al artículo 34 del RD 53/2013:

a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria;

b) su finalidad justifica la utilización de animales; y

c) está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible

5. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado de Universidad de Málaga en las siguientes fechas:

Reunión 20ª del 1/07/2016

Acta Nº 20 del 1/07/2016

Y

Reunión 23ª del 31/10/2016

Acta Nº 23 del 1/10/2016

Nº expediente 57-2016-A

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).

7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente EVALUACIÓN:

Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente

Favorable

Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento

Favorable



Pabellón de Gobierno, planta 3ª. Campus El Ejido. 29071. Tel.: 952 13 42 04
E-mail: ceuma@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado de Investigación y Transferencia
Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga
(CEUMA)

INFORME Nº: 42

Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad:

Procedimiento nº 1: Micro estimulación eléctrica o química cerebral con registro central y periférico y comprobación en cortes histológicos cerebrales de localización de zonas de estudio.

Evaluación: *Favorable*

Clasificación: Sin recuperación

Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente:

Favorable

Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013:

Situaciones: La investigadora Marta Gonzalez Garcia no posee la acreditación necesaria para realizar procedimientos de experimentación animal.

Excepciones: Colaborará en los procedimientos clasificados como leves, siempre bajo supervisión del Dr. Manuel Victor Lopez Gonzalez. Artículo 25.5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable. El periodo máximo hasta que consiga su acreditación es 6 meses.



Pabellón de Gobierno, planta 3ª Campus El Ejido 29071 Tel.: 952 13 42 04
E-mail: ceuma@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado de Investigación y Transferencia
Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga
(CEUMA)

INFORME Nº: 42

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuando debería realizarse

Motivación de la evaluación retrospectiva:

No procede

Resultado:

X No

Periodo de realización (en caso afirmativo): No procede

Documentación para realizar la evaluación retrospectiva (en caso afirmativo):

No procede

CONFIRMO:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:

Proyecto Tipo II

3. Que la evaluación del proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, resulta ser:

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Secretario Órgano Habilitado
Nombre: Ricardo González Carrascosa Latin
Fecha: 01/11/2016
Firma:

Presidente Órgano Habilitado
Nombre: Teodomiro López Navarrete
Fecha: 01/11/2016
Firma:



EFQM

AENOR



Pabellón de Gobierno, planta 3ª, Campus El Ejido. 29071 Tel.: 952 13 42 04
E-mail: ceuma@uma.es

CONTROL CENTRAL DE LA VOCALIZACIÓN: EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE REGIONES HIPOTALÁMICAS SOBRE LA ACTIVIDAD LARÍNGEA

Anexo 2

Permiso de la Junta de Andalucía para la experimentación animal en la UMA

JUNTA DE ANDALUCÍA		CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera
Fecha: 11/04/2017 Ref.: SSA/SIS/MD/117		UNIVERSIDAD DE MÁLAGA FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA HUMANA Att. de D. Marc Stefan Dawid Milner Capus de Teatinos s/n 29080 MALAGA
Asunto: Rem. Resolución experimentación.		

Se adjunta resolución de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, por la que se autoriza a D. Marc Stefan Dawid Milner, un proyecto de experimentación animal denominado: "Investigación en el Control Nervioso de la Respiración, Circulación y Emociones".

JEFE DEL SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL.



Fdo: Manuel Fernández Morente.



Tabladilla, s/n
Teléfono 95 5032000
41071 - Sevilla

Código:640xu731PFIRMAxE31WG2InWM/mn8v. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MANUEL FERNANDEZ MORENTE	FECHA	12/04/2017
ID. FIRMA	640xu731PFIRMAxE31WG2InWM/mn8v	PÁGINA	1/1

JUNTA DE ANDALUCIA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y GANADERA POR LA QUE SE AUTORIZA A D. MARC STEFAN DAWID MILNER UN PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Examinada la solicitud de autorización de D. Marc Stefan Dawid Milner, con D.N.I. 15843239B, para la realización de un proyecto de experimentación animal, se han apreciado los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero. Con fecha 16 de Marzo de 2017, D. Marc Stefan Dawid, en su condición de responsable del proyecto, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación: "Investigación en el Control Nervioso de la Respiración, Circulación y Emociones".

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el informe del Comité Ético, resumen no técnico e informe de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo. La documentación aportada acredita que el interesado tiene la titulación y formación específica para desarrollar proyectos experimentales con animales y cuenta con la capacitación específica para ello.

Tercero. El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como centro usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES290470001512.

Cuarto. Con fecha 01 de Noviembre de 2016, el Comité de Ética del centro emiten un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Quinto. Con fecha 01 de Noviembre de 2016, Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Málaga, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el procedimiento cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero. El artículo 3.2 del Decreto 133/2005, de 24 de Mayo, por el que se regula la distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca, dispone que corresponde a la segunda "la autorización previa de toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte, prevista en el artículo 7.2 de la Ley".

Por su parte, artículo 13 del Decreto 215/2015, de 14 de Julio, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural prevé:

"Corresponde a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, además de las funciones establecidas en el artículo 30 de la Ley 9/2007, de 22 de octubre, las siguientes:

- i) La ordenación y fomento de la protección y del bienestar animal".



Código:640xu848PFIRMAo4Z2LKEgImCvcPKz			
Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGEL OLVERA PORCEL	FECHA	11/04/2017
ID. FIRMA	640xu848PFIRMAo4Z2LKEgImCvcPKz	PÁGINA	1/3

CONTROL CENTRAL DE LA VOCALIZACIÓN: EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE REGIONES HIPOTALÁMICAS SOBRE LA ACTIVIDAD LARÍNGEA

Segundo. El artículo 7.2 de la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, manifiesta que "toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte requerirá autorización previa de la Consejería competente por razón de la materia y supervisión veterinaria".

Por su parte, el artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable".

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

"1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva".

Tercero. El artículo 15 del RD 53/2013 de 1 de febrero, establece que el órgano competente podrá autorizar que personas que aún no hayan demostrado su total capacitación desempeñen esas funciones de forma temporal y bajo supervisión responsable. El artículo 11.2 de la Orden ECC/556/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, establece que "siempre que, en el caso de la función de realización de los procedimientos, las actuaciones sobre los animales sean un procedimiento clasificado como leve o sin recuperación. Este periodo provisional no podrá tener una duración superior a seis meses.



Código:640xu848PFIRMAo4Z2LKEgI=CvcPKz. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGEL OLVERA PORCEL	FECHA	11/04/2017
ID. FIRMA	640xu848PFIRMAo4Z2LKEgI=CvcPKz	PÁGINA	2/3

CONTROL CENTRAL DE LA VOCALIZACIÓN: EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE REGIONES HIPOTALÁMICAS SOBRE LA ACTIVIDAD LARÍNGEA

Cuarto. El artículo 19.1 del Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales establece:

"Todos los establecimientos cuyo objeto sea la producción, comercialización o uso de animales con fines experimentales, científicos o educativos ubicados en la Comunidad Autónoma de Andalucía, previo al inicio de la actividad, de conformidad con lo establecido en el artículo 7 de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, deberán inscribirse en el Registro Único de Ganadería de Andalucía, en la sección de Explotaciones Ganaderas de Andalucía, de conformidad con el artículo 33 y deberán contar para su inscripción con la autorización prevista en el artículo 36.1 de la Ley 8/2003, de 24 de abril".

Quinto. El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del tipo II, puesto que implica procedimientos clasificados como, sin recuperación y no utiliza primates. Además, el centro donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización y la persona encargada de la realización del proyecto tiene capacitación para ello. A ello se une el carácter favorable de los informes emitidos al respecto, por lo que cumpliendo con los requisitos previstos ha de procederse a su autorización y no debe someterse a evaluación retrospectiva.

En consecuencia, de conformidad con los preceptos citados y demás de general aplicación,

RESUELVO

Primero. Autorizar a, D. Marc Stefan Dawid Milner, el proyecto denominado: "Investigación en el Control Nervioso de la Respiración, Circulación y Emociones", por un periodo de 5 años .

Segundo. Asignar el número 30/03/2017/054 al proyecto a los efectos de cumplir con lo requerido en el art. 41.1 del RD 53/2013 de 1 de febrero y la Decisión 2012/707/UE, sobre la regulación y transmisión de información referente al uso de los animales.

Tercero. Autorizar a Dª Marta González García, a participar con anterioridad a finalizar su total capacitación en el proyecto bajo supervisión responsable, en actuaciones o procedimientos leve o sin recuperación por período no superior a seis meses.

Cuarto. Ordenar la notificación de la presente Resolución a la persona interesada, con indicación de que contra la misma, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante la Sra. Consejera de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación del presente acto, de conformidad con lo establecido en el artículo 121 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Sevilla, 30 de Marzo de 2017
EL DIRECTOR GENERAL DE LA PRODUCCIÓN
AGRICOLA Y GANADERA.

Fdo.: Rafael Olvera Porcel.



Código:640xu848PF1RMAo4Z2LKEgImCvcPKz. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGEL OLVERA PORCEL	FECHA	11/04/2017
ID. FIRMA	640xu848PF1RMAo4Z2LKEgImCvcPKz	PÁGINA	3/3