

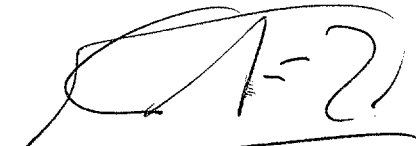
27/1995-96

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO


Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO "Cum Laude" por unanimidad Las Palmas de G. C., a 24 de febrero de 1996.

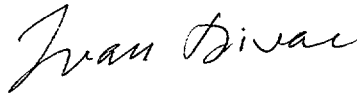
El Presidente: Dr. D. Antonio J. Fernández Rodríguez



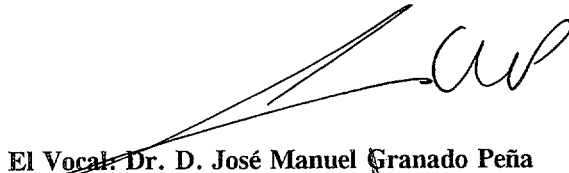
La Secretaria: Dra. Dña. Maximina Monzón Mayor,



El Vocal: Dr. D. Ivan Divac,



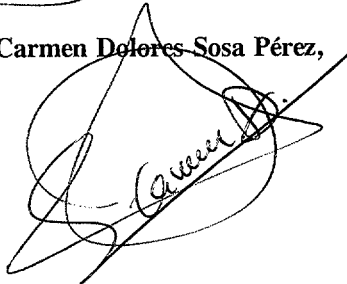
El Vocal: Dr. D. Agustín Castañeyra Perdomo,



El Vocal: Dr. D. José Manuel Granado Peña



La Doctoranda: Dña. Carmen Dolores Sosa Pérez,





BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
N.º Documento 402.541
N.º Copia 402.563

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Doctorado en Medicina y Cirugía
Departamento de Morfología



**Distribución regional y evolución con la
edad de las neuronas productoras
de óxido nítrico
de la corteza cerebral de la rata**

**Tesis Doctoral presentada por Dña. Carmen Dolores Sosa Pérez.
Dirigida por los Drs. D. José Regidor García y D. Juan Andrés
Ramírez González.**

El Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Regidor", written over a horizontal line.

El Codirector

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Juan Andrés Ramírez González", written over a horizontal line.

El Doctorando

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carmen Dolores Sosa Pérez", written over a horizontal line.

Las Palmas de Gran Canaria, Diciembre de 1.995

**D. José Regidor García, Catedrático de Biología Celular, y
D. Juan Andrés Ramírez González, Titular de Ciencias
Morfológicas, Profesores de la Universidad de Las Palmas de
Gran Canaria,**

INFORMAN

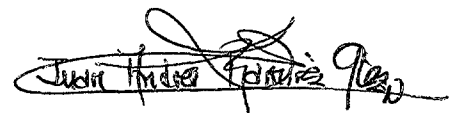
Que Dña. **Carmen Dolores Sosa Pérez**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección la presente memoria, "**DISTRIBUCIÓN REGIONAL Y EVOLUCIÓN CON LA EDAD DE LAS NEURONAS PRODUCTORAS DE ÓXIDO NÍTRICO DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA**", que consideramos apta para su defensa pública ante el Tribunal designado a tal efecto con el fin de optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

El Director



Fdo.: J. Regidor

El Codirector



Fdo.: J.A. Ramírez

Las Palmas de Gran Canaria, Diciembre de 1.995

Índice

	pág.
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Lista de Abreviaturas	IV
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Objetivos	24
2. Material y métodos	25
2.1. Material	27
2.2. Métodos	29
3. Resultados	41
3.1. Animales adultos	43
3.2. Animales viejos	79
3.3. Animales jóvenes	102
3.4. Inmunohistoquímica	107
4. Discusión	109
4.1. Actividad biológica de la NADPH-d	111
4.2. NOS/NADPH-d cortical	118
4.3. Neuropilo	125
4.4. Efecto del envejecimiento	128
4.5. Control del flujo sanguíneo cerebral	128
5. Conclusiones	133
5.1. Conclusiones	135
6. Bibliografía	137
6.1. Bibliografía	139
7. Iconografía	159

**A mis padres
A Luz
A Hildebrando**

Agradecimientos

Al terminar un trabajo como éste, una, mira hacia atrás y recuerda a todas las personas que le han prestado su apoyo. Y sería de mal agradecida no recordarlos aquí antes de presentar la memoria del mismo.

En especial me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Prof. Dr. D. José Regidor García, director de esta tesis, por prestarme siempre su apoyo y su constante guía en la realización de esta tesis doctoral, y de forma muy especial por aquel trabajo que queda oculto y sin el cual hoy no estaría escribiendo estas líneas. GRACIAS.

Al Prof. Dr. D. Juan Andrés Ramírez González, codirector de la tesis, que además de todo el apoyo en el plano profesional y en la realización de este trabajo, ha sido y es un amigo.

A Concepción Hernández Urquía, por todo su apoyo técnico sin el cual gran parte de este trabajo no se hubiese podido realizar, pero muy en especial por estar en los momentos de desánimo y ser toda una compañera y más especialmente una amiga. Para que pronto estés en mi misma situación.

A José Mondesteoca, por darme en todo momento ánimos para terminar este trabajo, así como pasarme toda la información que llegaba a sus manos.

A Antonio Escobar, que en los comienzos me apoyó y enseñó a desenvolverme en algunos de los técnicas de trabajo que necesitaba.

A Francisca Rodríguez, oficial del laboratorio, que desde su llegada siempre ha estado dispuesta a prestarme su ayuda en lo que necesitara.

A los compañeros de Departamento y amigos que me han ayudado y dado ánimos, entre ellos a Diego Hernández, que ya no se encuentra trabajando con nosotros, que me dio fuerzas para seguir adelante cuando no podía más.

A la **Fundación Universitaria**, especialmente a la **Familia Mejías-Martínez**, por concederme la Beca que me permitió comenzar este trabajo.

Al **Gobierno Autónomo de Canarias**, por el proyecto GAC 114/08.03.90 con el que se ha financiado gran parte de esta tesis.

No puedo olvidar a mis padres y a mi hermana, Luz, por su apoyo constante en todos los aspectos, por darme fuerzas para continuar y enseñarme el lema familiar de que "las cosas despacio salen y que no hay que poner el carro delante de los caballos".

Y, por último, y aunque él no quiere que lo nombre, a Hilde, por saber estar, prestarme su apoyo en los momentos de desánimo y por ayudarme en parte del trabajo de escritura y presentación de esta memoria. Y como no, por saber convivir conmigo en los buenos y malos momentos.

Resumen

- Comprobamos la existencia de neuronas NOS/NADPH-d a lo largo de la corteza cerebral excepto en la región correspondiente al "indusium griseum".

- Las encontramos en diferente proporción según las capas: la capa I casi no posee células marcadas (2 o 3 por animal), las capas II/III y VI son las que las presentan en mayor cantidad. En las capas IV y V son menos abundantes.

- Se ha comprobado la existencia de espacios, vacíos de neuronas NOS, de distinta amplitud, distribuidos de forma particular según las distintas áreas corticales.

- Las neuronas NOS son no-piramidales y no espinosas, de morfología predominantemente **bipenachada vertical**, aunque las multipolares estrelladas también son abundantes. Además se observan formas bipolares (son las menos numerosas), bipenachadas horizontales, multipolares en "T" y un tipo neuronal no clasificable entre los tipos morfológicos habituales. A este último lo hemos denominado de **neuronas atípicas** y está constituido por células que poseen un soma alargado, carente de una forma definible y con un árbol dendrítico poco abundante.

- Describimos la íntima relación existente entre algunas de las neuronas NOS/NADPH-d y los vasos sanguíneos corticales.

- Se comprueba la existencia de un rico neuropilo distribuido de forma diferente en cada una de las áreas corticales.

- Se encuentran diferencias significativas, con la edad, en la distribución del neuropilo y de las neuronas piramidales de las diferentes poblaciones animales.

Abreviaturas

Áreas corticales

AID	área insular dorsal
AIP	área insular posterior
Cg	áreas cingulares
FL	área motora de la extremidad anterior
Fr	área frontal
Gu	área gustativa
HL	área motora de la extremidad posterior
IG	indusium griseum
Oc	área occipital
Oc_{1B}	área occipital binocular
Oc_{1M}	área occipital monocular
Oc_{2MM}	área occipital medio-medial
Oc_{2ML}	área occipital medio-lateral
Oc_{2L}	área occipital lateral
Par	área parietal
PRh	área perirhinal
RS	área retrosplenial
RSA	área retrosplenial agranular
RSG	área retrosplenial agranular

Otras

ADN	ácido desoxirribonucleico
CCK	colecistocinina
CPR	reductasa del citocromo P450
EDRF	factor relajante derivado del endotelio
FAT	flavín-adenín-dinucleótido
FMN	flavín-adenín-mononucleótido
GABA	ácido gamma-amino-butírico
GMP_c	guanilil-monofostato-cíclico
GTP	guanilil-trifostato
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido-fostato
NOS	óxido nítrico sintasa
NOS_e	óxido nítrico sintasa endotelial (NOS III)
NOS_i	óxido nítrico sintasa inducible (NOS II)
NOS_n	óxido nítrico sintasa neuronal (NOS I)
SNC	sistema nervioso central
SNC	sistema nervioso periférico
VIP	péptido intestinal vasoactivo

1. Introducción

ANTECEDENTES

Las primeras descripciones que se hicieron de las neuronas con la enzima NADPH-diaforasa, son las realizadas en los trabajos pioneros de Thomas y Pearse (1.961, 1964) y por Duckett y Pearse (1.964) donde se refieren a ellas como "células solitarias", aunque esten distribuidas prácticamente por todas las áreas cerebrales. Estas neuronas se identificaban selectivamente utilizando una reacción histoquímica que ponía de manifiesto la presencia de una deshidrogenasa, la **diaforasa de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido** (NADPH-d). En esencia, las neuronas que poseen esta enzima utilizarían el NADPH para reducir una sal de tetrazolio dando como resultado el formazán, producto insoluble que presenta un color azul (Thomas and Pearse, 1.964).

Aunque algunos autores confirmaron la presencia de tales neuronas no se les dió mucha importancia hasta que su existencia pudo ser demostrada en tejido fijado con aldehídos (Vincent & Kimura, 1992).

Con la puesta a punto, por Scherer-Singler et al. (1.983), de una modificación de la técnica histoquímica para la determinación de la NADPH-diaforasa en tejido fijado con aldehidos, se consiguió una mayor eficacia y reproductibilidad técnica en la determinación de la enzima. Este hecho, unido a la

Introducción

constatación de la coexistencia de la NADPH-diaforasa con los neuropéptidos somatostatina y Neuropéptido Y en ciertos centros nerviosos (Vincent et al., 1.983_a), reavivó el interés por conocer más detalladamente las poblaciones neuronales que contienen NADPH-diaforasa. Por esa razón, la aparición de estudios analizando la presencia de la NADPH-diaforasa en diversos centros nerviosos de diferentes especies animales ha sido continúa desde entonces. Así, podemos referirnos a los estudios sobre el estriado de la rata (Vincent et al., 1.983_a); corteza visual del mono (Sandell, 1.986); estriado humano (Kowall et al, 1.987); corteza cerebral de reptiles (Regidor y Poch, 1.987); corteza cerebral humana (Kowall & Beal, 1.988); sustancia blanca de la corteza cerebral del gato (Mizukawa et al., 1.988_b); retina de conejo (Vaney y Young, 1.988); telencéfalo de gato (Mizukawa et al. 1.989); estriado y neostriado y telencéfalo basal (Schober et al., 1.989); corteza visual de la rata (Hedlich et al., 1.990); hipocampo del mono (Mufson et al., 1.990); complejo amigdalino humano (Sims & Williams, 1.990); telencéfalo basal de la rata (Pasqualotto y Vincent, 1.991); hipotálamo humano (Sangruchi y Kowall, 1.991); médula espinal de reptiles (Luebke et al., 1.992); cerebelo de la rata (Southan et al., 1.992); médula espinal de la rata (Valtschanoff et al., 1.992); bulbo olfativo de la rata (Alonso et al., 1.993); sistema auditivo de la rata (Druga & Syka, 1.993); ganglios basales de mamíferos (Geula et al., 1.993); amígdala de la rata (McDonald et al., 1.993); corteza cerebral humana (Fischer & Kuljis, 1.994); corteza cerebral del gato (Kuchiiwa et al., 1.994); hipotálamo de la rata (Miyagawa et al., 1.994).

La enzima NADPH diaforasa también ha sido estudiada en el desarrollo embrionario y postnatal de diferentes áreas cerebrales: hipocampo de rata (Mellgren, 1.973); telencéfalo de ratón (Derer & Derer, 1.993); neocortex de la rata (Yan et al., 1.994); corteza prefrontal de la rata (Tomic et al., 1.994) y telencéfalo de la rata (Samama et al., 1.995).

Varias revisiones y estudios generales de la distribución de células con NADPH diaforasa en el cerebro de la rata (Leigh et al., 1.990; Vincent y Kimura, 1.992) y del gato (Mizukawa et al., 1.989), han permitido tener una idea global de la tipología y la distribución de esta población de neuronas en los diversos centros nerviosos.

En sus estudios caracterización histoquímica de la NADPH-d, Hope and Vincent (1.989) quienes, por medio de una caracterización histoquímica, determinaron que se trataba de un enzima fijado a membrana y diferente a las otras deshidrogenasas conocidas. La enzima NADPH-diaforasa es, portanto, una más de las deshidrogenasas presentes en el sistema nervioso central (SNC) y en el periférico, cuya función en el metabolismo nervioso era desconocida (Mellgren, 1.973; Sims et al., 1.974), lo que condicionó la escasa atención que se le prestó durante casi una década. No obstante, era previsible considerar que las neuronas que poseían la NADPH-d debían jugar algún papel importante en el SNC.

relación de la enzima nadph-diaforasa con la formación de óxido nítrico en el sistema nervioso.

El descubrimiento, realizado en 1.980 por Furchgott y Zawadski, de que el endotelio jugaba un papel fundamental en la vasodilatación y de que esa actividad se realizaba mediante la síntesis y liberación por el mismo de una molécula que actuaba sobre las fibras musculares, desconocida en ese momento -y a la que ellos denominaron EDRF (factor relajante derivado del endotelio)-, permitió que años más tarde dos equipos distintos de farmacólogos establecieran experimentalmente que el postulado EDRF era una molécula sorprendente: el radical libre óxido nítrico -NO- (Ignarro et al., 1.987; Palmer et al., 1.987).

Esta molécula biológica fue en un comienzo recibida con bastante excepticismo por la comunidad científica, aunque en la actualidad está absolutamente aceptada.

Establecido que el óxido nítrico podía considerarse como un nuevo mensajero celular (Bredt & Snyder, 1.994_b) con características y propiedades peculiares, y conocida la ruta metabólica para su formación (Palmer et al., 1.988; Moncada et al., 1.991_a), pronto fue determinada su presencia en múltiples sistemas orgánicos (Moncada et al., 1.991_b).

Las primeras observaciones, en las que se estudió el papel que jugaba el NO en el funcionamiento del cerebro, fueron hechas por Miki et al. en 1.977, quienes encontraron que, en homogeneizados de corteza cerebral de ratón, la enzima guanilato ciclasa era activada por el NO.

En 1.988, Garthwaite et al., en sus trabajos sobre los efectos de los neurotransmisores activadores en el cerebelo, reconocen al óxido nítrico como un mensajero celular en el sistema nervioso implicado en la activación de la enzima guanilato ciclasa, circunstancia que abrió nuevas e importantes perspectivas en el estudio de su función en la actividad cerebral. La presencia de la enzima formadora de óxido nítrico, la óxido nítrico sintasa (NOS), en el cerebro fue confirmada por Knowles et al., (1.989) y subsiguientemente purificada por Bredt y Snyder, (1.990) y clonada y secuenciada por Bredt et al., (1.991).

La relación entre la NOS y la NADPH-diaforasa fue considerada por primera vez por Hope & Vincent, en 1.989, y definitivamente establecida de forma paralela por Dawson et al., 1.991 y por Hope et al., 1.991. Coinciden ambos estudios en la íntima relación entre las dos enzimas, considerándose que la actividad NADPH-diaforasa es parte del complejo enzimático de la NOS. Además, se comprueba, tanto en el cerebro como en el sistema nervioso periférico (SNP), que la localización de la NOS se corresponde con la NADPH-diaforasa (Dawson et al. 1.991). Estos datos permitieron reinterpretar la información disponible hasta el momento acerca

Introducción

de las neuronas con NADPH-diaforasa, las cuales podían considerarse, entonces, como células productoras de óxido nítrico en el sistema nervioso.

El empleo de anticuerpos contra la NOS cerebral permitió el estudio de su presencia en diversos centros nervioso (Aoki et al., 1.993; Bredt et al., 1.991_a; Dun et al., 1.992; Egberongbe et al., 1.994; Grossman et al., 1.994; Hashikawa et al., 1.994; Holmqvist et al., 1.994; Nisbet et al., 1.994; Peng et al., 1.994; Snyder & Bredt, 1.991; Sugaya & McKinney, 1.994; Valtschanoff, 1.993_a y 1.993_b; Wenland et al., 1.994), incluyendo un amplio estudio sobre la distribución de las neuronas con NOS en el sistema nervioso central de la rata (Rodrigo et al., 1.994). Todos estos estudios completan, y coinciden con pequeñas discrepancias, los datos obtenidos mediante la aplicación de la histoquímica de la NADPH diaforasa.

el oxido nitrico y la sintasa del oxido nitrico.

El NO es una molécula pequeña, un radical, que es producida inicialmente como un gas y que tiene una vida media de 2 a 30 sg.. Posee la importante característica de poder difundir libremente a través de las membranas biológicas.

La enzima generadora de este gas, el NO, es la sintasa del NO (NOS). Éste es producido por medio de una reacción de deaminación oxidativa del aminoácido (aa) L-arginina, siendo una típica reacción de óxido-reducción conocida como "la

ruta de la L-arginina-NO" (Palmer et al., 1.988; Moncada et al., 1.991_a). Para que la enzima realice esta reacción se requiere la presencia de las moléculas de O₂, calmodulina, tetrahidrobiopterina (BH₄), el grupo Hemo y los coenzimas NADPH, FAD y FMN, y como producto se obtiene otro aminoácido -la L-citrulina- y el NO (Moncada et al., 1.991_a; Griffith & Stuehr, 1995).

El NO puede ser producido por una gran variedad de células y tejidos en los diferentes órganos, con una variedad de funciones fisiológicas enormes, entre las que destacamos la vasodilatación, la agregación y adhesión plaquetaria, la citotoxicidad, el control de la secreción hormonal y neuronal, etc. (Moncada et al., 1.991_b; Lowenstein et al., 1.994).

De la enzima productora del NO se conocen y se han podido caracterizar tres isoenzimas (Bredt & Snyder, 1.994_b; Knowles & Moncada, 1.994) de las cuales la primera fue descubierta en el sistema nervioso central (SNC) por lo que se le llamó "neuronal" (Bredt & Snyder, 1.990). De las otras dos, una se encontró en los macrófagos, se la denominó "inducible" (Lowenstein et al., 1.992; Lyons et al., 1.992; Xie et al., 1.992), y la otra en el endotelio vascular, llamandose la "endotelial" (Janssens et al, 1.992; Lamas et al, 1.992).

Actualmente se ha podido demostrar que estas sintasas se encuentran, además, en otros tejidos diferentes a los que inicialmente fueron descubiertas

Introducción

(Nathan, 1.992), por lo que en estos momentos se denominan de la siguiente manera:

- A la neuronal (NOSn) tipo I
- A la inducible (macrofagos, NOSi) tipo II
- A la endotelial (NOSe) tipo III

Las tipo I y tipo III son constitutivas y dependientes de Ca^{++} , es decir, para que el enzima se active es necesario que exista Ca^{++} libre en el citosol en ese momento, mientras que la tipo II, la inducible, no necesita del Ca^{++} y ya es activa desde que es producida.

Las tres isoenzimas presentan un lugar de unión para el coenzima NADPH y los coenzimas flavínicos FAD Y FMN. También poseen las tres un lugar de unión para la calmodulina, circunstancia que se da también en la tipo III, aunque no sea Ca^{++} dependiente. Y todas se unen, asimismo, a la tetrahydrobiopterina (BH_4).

Las NOS tipo I y III poseen, además, un lugar de fosforilización (Bredt et al., 1.992) que no esta presente en la tipo II. Por otro lado, la tipo III tiene un lugar de miristilacion que es el que le permite la unión a la membrana, por lo que la tipo III es un enzima ligado a membrana mientras que, la I y la II, al no poseerlo, son enzimas solubles, citoplasmáticas (Pollock et al, 1.991; Busconi & Michel, 1.993).

La regulación de este enzima, como se ve, es múltiple y muy importante, porque el NO no puede ser almacenado, captado o inactivado, después de la liberación sináptica por los mecanismos convencionales de regulación. Es, por tanto, uno de los enzimas biológicos más regulados.

La reacción y la regulación varía entre las NOS constitutivas y la inducible. La primera diferencia es la disponibilidad del enzima: mientras que las constitutivas siempre están presentes, la inducible se produce después de que la célula recibe una señal que induce su producción.

La reacción para la activación y producción del NO, teniendo la misma consecuencia final, presenta importantes diferencias. Así, en la inducible, después de ser activada su producción, obtenemos unos monómeros inactivos del enzima a los que se le une la calmodulina, sin que por ello se activen (Cho et al, 1.992) hasta estar en presencia de la L-arginina, el grupo hemo y la BH_4 , formándose ahora un dímero activo que genera la reacción de d-aminación de la L-arginina (Nathan & Xie, 1.994).

En el caso de las isoenzimas constitutivas, en las que el Ca^{++} es imprescindible, tenemos siempre monómeros inactivos en la célula, que unidos a la L-arginina, el grupo hemo y la BH_4 forman dímeros inactivos (Baek et al, 1.993; Schmidt et al., 1.991), a los que puede unirse el Ca^{++} -por medio de la

Introducción

calmodulina- y, activándose en ese momento, producen entonces una reacción análoga a la que sucede con la tipo II -la inducible- (Abu-Soud & Stuehr, 1.993).

La NOS tipo I (neuronal) puede ser identificada usando técnicas histoquímicas, que detectan la actividad NADPH-diaforasa (Vincent & Kimura, 1.992), o inmunohistoquímicamente, usando anticuerpos (Ac) producidos contra la NOSn (Bredt & Snyder, 1.992).

La caracterización y aislamiento de la NOSn, por Bredt and Snyder (1.990) en el cerebelo, fue lo que permitió reconocer inmunohistoquímicamente la localización de este enzima en el SNC.

la nos y el neurotransmisor glutamato.

Como ya se ha comentado, la NOSn, como la NOSe, es una enzima Ca^{++} dependiente. Uno de los caminos por los que el Ca^{++} puede entrar a la neurona es a través de el receptor NMDA-glutamato. Este receptor es una glucoproteína transmembranosa que actúa como canal selectivo de Ca^{++} : cuando el glutamato es liberado dentro de la hendidura sináptica puede unirse al receptor NMDA permitiendo entonces la entrada de Ca^{++} en la neurona postsináptica (Garthwaite et al., 1.991).

Este canal para el Ca^{++} tiene un complicado mecanismo de funcionamiento, con una amplia y selectiva regulación. Requiere, además de la presencia del neurotransmisor, de una depolarización de la membrana que permita la salida del interior del canal de un átomo de Mg^{++} que tapona físicamente dicho canal. Con todo, aún hay que tener en cuenta una serie de lugares de regulación, como es un punto de unión para la glicina, otro para el Zn y otro, en el interior del canal, que une drogas del tipo de la fenciclidina (PSP) o de la Ketamina.

La depolarización de membrana, necesaria para la liberación del Mg^{++} , se consigue por medio del propio glutamato que al unirse a otros receptores no-NMDA, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, permite la entrada masiva de Na^+ a la célula (Bredt & Snyder, 1994; Schuman & Madison, 1994).

Producida su entrada al interior de la neurona postsináptica el Ca^{++} , se une a la calmodulina en la NOS, la activa y el NO producido difunde hacia el exterior de la célula: de esta manera puede actuar sobre las células vecinas (neuronas, astrogliá, endotelio vascular e incluso a la neurona presináptica), así como sobre la propia célula generadora, pudiendo actuar a la misma vez como mensajero y como neurotransmisor (Garthwaite et al, 1991; Snyder and Bredt 1991). De igual manera, el calcio puede ser liberado de los reservorios intracelulares por la acción del trifosfato de inositol (IP_3) generado tras la activación de los receptores

Introducción

metabotrópicos de glutamato o por los receptores metabotrópicos de la noradrenalina o de la acetilcolina.

el NO como mensajero celular.

El NO en el SN es considerado como un mensajero celular atípico (Bredt & Snyder, 1994), ya que no necesita de un receptor, no se acumula en vesículas presinápticas y, una vez sintetizado, difunde libremente sin necesidad de transportador a través de las membranas. Hasta este momento no se conocía ninguna molécula, salvo el ácido araquidónico, que pudiera explicar dichas actividades y actuara de esta manera.

Dadas su propiedades físico-químicas, el NO puede actuar como un mensajero retrógrado difuso, siendo su acción diferente a la ya conocida de los modelos establecidos en la comunicación neuronal: por ej.; el feedback y la secreción paracrina de neuropéptidos. En este último caso, los mensajeros liberados por secreción paracrina requieren de receptores locales y, por consiguiente, la comunicación es selectiva; sin embargo, el NO liberado en el neuropilo puede actuar sobre todas las células de los alrededores. El feedback neuronal también ha sido considerado discreto y preciso, sin embargo, la acción retrograda del NO también es posible porque difunde libremente y no requiere de receptores en las células diana.

La actuación del NO se explica a partir de su propia naturaleza como radical libre, circunstancia que le lleva a presentar una gran avidez por unirse a otras de moléculas y de forma especial con algunas de ellas, entre las que se encuentran las que poseen un grupo hemo. El grupo hemo posee un Fe^{+++} , que le cede un e^- al radical NO, pasando del estado férrico (Fe^{+++}) al ferroso (Fe^{++}). La acción del NO sobre las proteínas hemo es amplia, ya que todas ellas son afectadas por el NO de alguna manera.

En el organismo, una de las moléculas que llevan este grupo hemo es la guanilato ciclasa, enzima que tomando GTP va a producir GMP_c , importantísimo mensajero celular que va actuar a su vez sobre una serie de proteínas, que están presentes en las neuronas y que para activarse requieren de su presencia por lo que dependerán, a su vez, de la activación de dicho enzima por la llegada del NO.

Pero no solo es el grupo hemo el que interactúa con el NO, también lo hace el cluster Fe-sulfuro: nitrosila una serie de proteínas, desfosforila a otras y actúa, también, sobre el ADN, con lo que realizan una serie de acciones sobre el propio material genético (Zhang & Snyder, 1995).

Como se comentó, lo importante, lo interesante de este mecanismo es que el NO producido en la célula postsináptica actúa sobre la célula presináptica y,

Introducción

hasta ahora, no había ningún sistema, ninguna molécula biológica conocida que presentara esta actividad (Snyder & Bredt, 1.991).

La postulación de un mensajero retrogrado ya había sido expuesta: Donald Hebb (1.949) intuía que tenía que existir algo que, de alguna manera, informara a la propia neurona estimuladora para que, de esta forma, se estableciera un proceso de aprendizaje. Él decía: "cuando el axón de una neurona A excita a una neurona B y lo hace de una forma repetitiva, se produce algún cambio en la estructura o el metabolismo de una o de las dos células, de tal forma que la eficiencia de A aumenta según se incrementa la actividad de B".

De este hecho conocido, desde hace ya 45 años, se desconocía la molécula responsable y es ahora cuando se puede ir evidenciando que molécula biológica puede tener relación con en esta actividad.

La actividad neuronal relacionada con los procesos de plasticidad, aprendizaje y memoria pueden ser explicadas aceptando la existencia de un mensajero celular de esta clase (Schuman & Madison, 1994).

regulación de la NOS.

El sistema debe estar regulado exquisitamente porque un sistema como éste no puede estar actuando de forma continua.

Y es la propia enzima NOS la que regula el sistema: el NO producido se une al grupo hemo de su sintasa y la inactiva (Rengasamy & Johns, 1.993; Rogers & Ignarro, 1.992). Por otra parte, también inactiva al receptor del glutamato, nitrosilándolo. Controlando, de esta forma, la producción del NO.

degradación del NO.

A pesar de todo esto, hay que tener en cuenta que, aunque el NO actúe de esta forma en el SNC en condiciones normales, los excesos del NO son neurotóxicos e intervienen en numerosos mecanismos fisiopatológicos cerebrales (Gross & Wolin, 1995).

De esta forma es como se utiliza el sistema de la NOS_i (tipo II) en la respuesta inmune, produciendo, justamente, grandes cantidades de NO para así destruir los elementos extraños (bacterias, tejido extraño...): es un rechazo tisular que actúa sobre ese tejido dañándolo, destruyéndolo y eliminándolo.

Introducción

La razón por la que el NO puede llegar a ser dañino esta en su propia naturaleza ya que es un **radical libre**. La célula produce habitualmente otros radicales libres entre los que encontramos el radical superóxido, que va a interactuar muy rápidamente con el NO para producir una nueva molécula que es el peroxinitrito (Stamler, 1994; Butler et al., 1995).

El peroxinitrito es una molécula absolutamente dañina para la célula, es un radical de una reactividad enorme, mucho más reactivo que el NO y va a ser el responsable de toda una serie de reacciones de peroxidación, fundamentalmente de peroxidación de lípidos. Desde el punto de vista biológico, la actuación sobre los lípidos va desencadenar una catástrofe celular, produciendo un mal funcionamiento de la célula e incluso puede llegarse a la destrucción de la misma.

El proceso puede continuar al ser reducidos los peroxinitritos, por una serie de protones; de esta forma se produce el radical nitrosilo que a su vez dará lugar al óxido nítrico que, sin embargo, no tiene actividad alguna pudiendo considerarse inocuo. Pero, además, se libera otro radical, el hidroxilo, que es el radical más dañino, más reactivo y más agresivo que se conoce.

De manera que, de forma directa, formando peroxinitrito, o de forma indirecta, por la degradación de estos peroxinitritos -liberando después un radical

hidroxilo-, nos encontramos con una molécula que producida en determinadas circunstancias puede ser extremadamente dañina para la célula.

la NOS y los vasos sanguíneos.

Otro de los procesos, en SNC, en los que parece estar relacionado de alguna manera el NO, es en el control del flujo sanguíneo cerebral (Umans & Levi, 1.995). En este proceso estaría implicado no sólo el NO producido por el endotelio de los vasos intracerebrales (Inagami et al, 1.995) sino también el producido por las neuronas (Estrada et al., 1.993; Regidor et al., 1.993_a; Zhang et al., 1.995).

Se debe de tener en cuenta que el cerebro responde de una manera particular a los requerimientos de un aumento en el flujo sanguíneo: no responde de manera masiva, sino que lo hace con un aumento a demanda según el trabajo que se vaya a realizar (Silver, 1.978).

Las neuronas necesitan fundamentalmente dos cosas para trabajar: oxígeno y azúcar (glucosa), sustancias que obtienen del flujo sanguíneo. Se puede considerar que el sistema nervioso posee dos sistemas para regular dicho flujo: un sistema basal, que hace que las neuronas esten funcionanado normalmente, y otro sistema de aumento a demanda, para poder sobrealimentar a las zonas que van a

Introducción

actuar momentaneamente. Incluso, a veces, el área que necesita un mayor flujo se reduce, en extensión, a la correspondiente a un solo vaso sanguíneo.

Teniendo en cuenta que se ha podido detectar una serie de neuronas productoras de NO que se encuentran completamente adheridas a los vasos sanguíneos cerebrales -situadas fundamentalmente en las zonas donde estos vasos sanguíneos se ramifican- hay autores, como Estrada et al. (1.993), Regidor et al. (1.993) y Zhang et al. (1.995), que postulan que, aparte de la posible activación y regulación que pueda tener la actividad de la NOS del endotelio de ese vaso, existe una activación adicional que va a ser de origen neuronal y que esta relacionada con estas neuronas adheridas a los vasos : el NO liberado va a difundir a su entorno llegando al músculo liso vascular y, por tanto, va a contribuir al aumento del flujo sanguíneo, ejerciendo un control absolutamente de tipo local.

NOS contenidas en el SNC.

La NOS contenida en las neuronas puede ser encontrada virtualmente en todas las regiones del cerebro, entre las que destacamos al neocortex y al hipocampo, que son dos regiones directamente involucradas en los procesos de aprendizaje y de memoria.

En la corteza cerebral -en el neocortex- vamos a encontrar dos grandes grupos de neuronas: las neuronas piramidales, abundantes y caracterizadas por poseer neurotransmisores excitadores clásicos, que son las que van a procesar la información, y las neuronas no-piramidales que, situadas precisamente entre las piramidales, modulan la actividad de éstas.

Por tanto, la actividad nerviosa global va a estar regulada por medio de una conjunción de actividades o de interrelaciones entre las neuronas excitadoras piramidales y las no-piramidales, en su mayor parte inhibitoras.

La primera NOS que se detectó en el cerebro fue la denominada neuronal, y fue observada en neuronas no-piramidales (Bredt et al., 1.991_b; Schmidt et al., 1.992; Valtchanoff et al., 1.993_b).

Entonces se dio por sentado que en el SNC, en la corteza cerebral, las neuronas que llevaban este enzima, eran neuronas no-piramidales. Pero investigaciones posteriores han indicado que, bajo determinadas circunstancias experimentales, neuronas piramidales del neocortex, o del hipocampo, pueden expresar NOS tanto "in vivo" (Regidor et al., 1.993_b) como "in vitro" (Divac et al., 1.993) y que dicha actividad, además, puede ser suprimida (Kitchener et al. 1.993; Regidor et al. 1.994).

Introducción

A nivel del hipocampo no se observa casi ninguna neurona que en condiciones normales manifieste la NOS, aunque si podemos ver una gran cantidad de neuronas piramidales en situaciones experimentales. Recientemente se ha confirmado que estas neuronas presentan la isoforma endotelial (Dinerma et al, 1.994), que parece ser la responsable de la producción de NO durante la potenciación sináptica de larga duración (LTP) (O´Dell et al, 1.994). Además, parece ser que las neuronas piramidales observadas en el neocortex con actividad NADPH-d (Regidor et al, 1.993_b) podrían expresar la isoforma endotelial (tipo III) (Divac et al, 1.993).

En definitiva, podemos considerar que las neuronas piramidales, mucho más abundantes que las no-piramidales, sin embargo no presentan la enzima neuronal; por el contrario, poseen la de tipo endotelial.

Además de lo ya expuesto, hemos de tener en cuenta que:

1.- el glutamato, como neurotransmisor, está relacionado con los procesos de potenciación sináptica de larga duración (LTP) que es uno de los fenómenos implicados en la base neuronal de la memoria (Siegelbaum and Kandel 1.991). El NO, ha sido propuesto como mediador "hebbiano" del aprendizaje (Gally et al. 1.990) tanto en los fenómenos de LTP (Bohme et al. 1.991) como en los fenómenos de LTD (Shibuki and Okada 1.991), lo implicaría la participación del NO

en los procesos de plasticidad neuronal y en el control del desarrollo de las redes neuronales (Gally et al. 1.990).

2.- existe una evidente relación del NO con los aminoácidos excitadores implicados en los procesos de neurotoxicidad, neuroprotección y neurodegeneración (Meldrum & Garthwaite 1.990; Beckman, J.S. 1.991), siendo de particular interés la relación existente con los procesos de envejecimiento cerebral, donde los neurotransmisores excitadores están directamente involucrados (Deutsch and Morihisa 1.988; Greenamyre et al. 1.988; Steele et al. 1.989; Kito et al. 1.990).

OBJETIVOS

En la realización de este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- **Establecer las características morfológicas** de las neuronas NADPH-diaforasa en la corteza cerebral de la rata adulta, atendiendo a su:
 - Distribución
 - Tipología neuronal
- 2.- **Establecer el patrón de distribución del neuropilo** en la rata adulta.
- 3.- **Estudiar las modificaciones** en dicha población neuronal y del neuropilo durante el proceso de envejecimiento.
- 4.- **Conocer la íntima relación** de estas neuronas con los vasos sanguíneos corticales.

2. Material y métodos

2.1.- ANIMAL DE EXPERIMENTACION.

En la realización de la parte experimental de nuestro trabajo hemos utilizado 65 ratas Sprague-Dawley a las que separamos en tres grupos:

A.-Fijadas con paraformaldehído.

B.-Fijadas con glutaraldehído.

C.-Tradadas para inmunohistoquímica.

A su vez cada uno de estos grupos se subdividen en tres poblaciones de edad a excepción de los animales de inmunohistoquímica:

El grupo A, fijado con **paraformaldéhído**:

A₁.-Adultas de 2 a 4 meses de edad

A₂.-Viejas de 23 a 36 meses de edad.

A₃.-Jóvenes de 1 mes de edad.

La población de adultas estaba formada por 24 animales en total: 20 hembras (11 de 2 meses, 7 de 3 y 2 de 4) y 4 machos (1 de 2 meses y 3 de 3).

Material y métodos

La población de viejas por 22 especímenes: 12 hembras (7 de 23 meses, 1 de 27, 1 de 30 y 3 de 36) y 10 machos (3 de 25 meses, 2 de 28, 1 de 30, 1 de 31, 2 de 32 y 1 de 34).

La población de jóvenes por 3 animales: todas hembras.

El grupo B, fijado con **glutaraldehído**:

B₁.-Adultos de 3 meses.

B₂.-Viejos de 23 a 36 meses.

B₃.-Jovenes de 1 mes.

Las poblaciones de adultos y viejas están constituidas por 3 animales cada una (todas hembras), mientras que la población joven incluía 4 ejemplares (2 machos y 2 hembras).

El grupo C de **inmunohistoquímica** estaba constituido por 6 animales adultos de 3 meses que se dividieron a su vez en tres grupos:

C₁.- 2 animales para la NOS neuronal o NOS I.

C₂.- 2 animales para la NOS endotelial o NOS III.

C₃.- 2 animales para la NOS inducible o NOS II.

Los animales fueron tratados en las condiciones de agua y alimentación comercial ad libitum y luminosidad habituales (12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad). En todos los casos, los animales fueron tratados siguiendo las especificaciones que, sobre utilización de animales de experimentación, ha dictado la Comunidad Europea.

2.2.-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

El protocolo seguido fue el siguiente:

2.2.1.-Técnicas quirúrgicas.

•Anestesia.

La anestesia de los animales se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal de Equithesín[®] a una dosis de 3,3ml/Kg de peso.

La composición del equithesín es la siguiente:

-Pentobarbital sódico	0,97 g.
-Etanol de 96°	7,6 ml.
-Hidrato de cloral	4,26 g.
-Propilen glicol	42,8 ml.
-Sulfato de Mg	2,1 g.
-Agua bidestilada	hasta 100 cc

Material y métodos

•Perfusión.

Anestesiado el animal se procedió a realizar la perfusión por vía intracardiaca. Una vez colocado en posición de decúbito supino sobre la mesa de intervención, realizamos una incisión longitudinal de la pared abdominal, accedemos al interior de la cavidad y separamos las estructuras hasta dejar visible el diafragma. Posteriormente, abrimos el diafragma y la parrilla costal es cortada lateralmente y separada ventralmente para acceder a la cavidad torácica y al corazón. Canalizamos el ventrículo izquierdo con una cánula que contiene suero fisiológico y ocluimos, con una pinza mosquito, la aorta descendente. Abrimos la aurícula derecha y mediante un sistema de perfusión neumático mantenemos una presión de perfusión de 70 - 80 mmHg. Después del "lavado" del sistema vascular continuamos con la solución fijadora, comenzando de esta forma la fijación del encéfalo y de la parte anterior del cuerpo, hasta inyectar alrededor de unos 450 cc, durante aproximadamente unos 20 minutos.

La solución fijadora fue diferente según los grupos: usamos la preparación de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M. con un pH de 7.4 en el grupo A y la solución de paraformaldehído al 0.5 % con glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M con un pH de 7.4 en el grupo B.

•Extracción y tallado del encéfalo.

Tras la perfusión se pone a descubierto el cráneo mediante el corte y disección de la piel y el legrado de los músculos que recubren el cráneo.

Estando el cráneo descubierto se van extrayendo a trozos los huesos del mismo hasta dejar visible la cara dorsal del encéfalo cubierto por las meninges, a continuación abrimos la duramadre, se movilizan los bulbos olfatorios, los nervios ópticos y pares craneales en general y se va levantando el encéfalo hasta extraerlo por completo. Por último, se limpia de meninges y es depositado en la solución de post-fijación, que es la misma para ambos grupos, paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M con un pH de 7.4, donde permanecerá durante 2 horas a 4° C. Después el cerebro es lavado con tampón fosfato 0,1 M. a pH 7.4 durante 15 minutos y finalmente pasan a sacarosa al 15% en tampón fosfato 0,1 M. a pH 7.4 durante toda la noche, en nevera.

Los cerebros fueron fraccionados en dos piezas por medio de un corte coronal a un nivel que corresponde aproximadamente al quiasma óptico.

Material y métodos

2.2.2.-Técnicas histológicas.

Una vez extraídos los cerebros, post-fijados y troceados fueron procesados de la siguiente forma:

Se realizaron cortes coronales de 50 micras en vibratomo Bio-rad Micro-cut H-1.200.

Se obtuvieron cortes seriados que se distribuyeron en tres o cuatro series paralelas:

- 1.- Nissl
- 2.- NADPH-diaforasa o NADP-diaforasa
- 3.- Una de reserva en solución crioprotectora.

Ocasionalmente se realizó una serie más en la que realizamos las técnicas de acetil-colinesterasa o de citocromo-oxidasa.

La técnica del Nissl se utilizó como control en la delimitación de las capas y los campos de la corteza cerebral.

Las técnicas de NADPH-diaforasa (directa e indirecta) fueron utilizadas para marcar las neuronas con sintasa del óxido nítrico.

•Técnica de Nissi

Los portas de nuestra primera serie fueron teñidos con Violeta de cresilo:

-Etanol absoluto	60 ml.
-Agua destilada	300 ml.
-Acido acético glacial	10 ml.
-Violeta de cresilo	1,5 g.

Después de teñidos los cortes fueron deshidratados, aclarados con xilol y montados con Eukitt.

2.2.3.-Técnicas histoquímicas.

Para el marcaje de las neuronas NO sintasa hemos utilizado dos técnicas distintas obteniendo resultados que consideramos equiparables.

Para la **NADPH-diaforasa directa** se utilizó la técnica descrita por Vincent S.R. and Kimura 1992.

Para la **NADPH-diaforasa indirecta** utilizamos la técnica descrita por Scherer and Singer (1983), y por Vincent (1983).

Material y métodos

•NADPH-diaforasa (método directo)

El medio de incubación consistió en:

-Tampón fosfato 0,2 M a pH 7,4	50 cc.
-Triton X-100	0,3 cc.
-NBT	0,01 g.
- β -NADPH	0,1 g.
-Agua bidestilada	Hasta 100cc.

Los cortes fueron incubados en suspensión en condiciones de oscuridad y alrededor de 37° C., durante aproximadamente 60 minutos y comprobado al microscopio que la tinción era la óptima. Posteriormente los cortes fueron lavados, colocados en los portas, secados, deshidratados y montados con Eukitt.

•NADPH-diaforasa (método indirecto)

El medio de incubación consistió en:

-Tris-ClH 1 M. (pH 8)	10 ml.
- β -NADP	0,07654 g.
-NBT	0,0165 g.
-Solución malato 150 mM.	10 ml.
-Tween 80	0,4 ml.
-Agua bidestilada	hasta 100 ml.

En esta técnica los cortes, antes de ser incubados, son lavados en agua corriente y luego se incuban en oscuridad y alrededor de 37°C durante un tiempo aproximado de 90 minutos; al igual que en la técnica anterior fueron comprobados al microscopio. Nuevamente fueron lavados, colocados en los portaobjetos, deshidratados y montados con Eukitt.

•Serie de reserva

La intención de esta serie es mantener el material a -20° C preservandolo de daño tisular, con el fin de poder utilizarlo en la realización de estudios posteriores.

Para ello utilizamos una solución anticongelante compuesta por:

-30% de glicerol.

-30% de etilenglicol.

-40% de tampón fosfato 0,1 M. a pH 7,4.

2.2.4.-Técnica inmunohistoquímica.

Se utilizó la técnica indirecta de **avidina-biotina**. Los cortes fueron procesados para los diferentes tipos de NOS, con anticuerpos cedidos por Ogura et al. (1993). Otras secciones fueron procesadas con la técnica

Material y métodos

histoquímica para detectar la enzima NADPH-diaforasa y poder comprobar los resultados.

2.2.5.-Metodología de estudio.

El presente estudio abarca longitudinalmente la totalidad de la corteza cerebral, desde la porción rostral hasta la caudal, y transversalmente se extendió desde la cisura interhemiférica hasta la región de la cisura rinalis. En todos los casos se estudió el mismo hemisferio cerebral.

•Técnica de obtención de datos.

Para el análisis de las muestras realizamos, de cada corte obtenido del cerebro de un animal, una lámina a cámara clara en un microscopio Leitz Orthoplan. Se utilizó un objetivo de 2,5X, con el que se obtuvo una proyección en la lámina de 1 mm. = 2cm.

En cada lámina dibujamos el contorno de la corteza cerebral, delimitando la pámadre y la sustancia blanca, sobre la que marcábamos con un punteado los somas de las neuronas con sintasa del óxido nítrico después de la comprobación de la correcta posición de los mismos con un objetivo de 25X.

Para poder relacionarlas, con el corte, el cerebro y el animal al que pertenecía, las láminas fueron numeradas de la siguiente forma:

1º se indicaba el número del animal

2º la técnica realizada

3º la edad y sexo del animal

4º se añadian tres dígitos:

- el primero indicaba la serie
- el segundo el porta
- el tercero que posición que ocupaba el corte en su porta

De cada lámina realizamos dos tipos de reproducciones unas a papel corriente y otras a papel vegetal.

Las de papel corriente se utilizaron para marcar las diferentes áreas corticales siguiendo el esquema propuesto por Karl Zilles en su atlas esterotáxico de la corteza cerebral de la rata (Zilles, 1985).

En las de papel vegetal se marcaron con una serie de signos los diferentes tipos neuronales, que se estudiaron con un objetivo de 25X en microscopio óptico Leiz Orthoplan..

preparaciones obtenidas con las correspondientes a los animales de paraformaldehído: estudiamos y comparamos los datos obtenidos directamente desde el porta, utilizando la otra fijación como referencia.

2.3.-COMPLICACIONES.

La supervivencia de los ejemplares de edad avanzada -más de dos años de vida- se vió comprometida por la presentación de tumoraciones, de diferente naturaleza y topografía, que afectaban seriamente la vida de los especímenes y, por tanto, la viabilidad de nuestros experimentos.

3. Resultados

Hemos centrado nuestro estudio tanto sobre las neuronas que aparecen marcadas como sobre las fibras, también marcadas, que conforman el neuropilo. Se ha intentado seguir en los diferentes estudios un orden rostro-caudal y medio-lateral en la descripción de las áreas corticales.

3.1.- ANIMALES ADULTOS

La sistemática de nuestro estudio atiende a los siguientes apartados:

- Descripción del patrón de distribución del neuropilo en las diferentes áreas.

- Tipología neuronal de las neuronas con sintasa del óxido nítrico en la corteza y su distribución:

 - Desde la capa I a la capa V.

 - De la capa VI y la sustancia blanca.

- Agrupaciones neuronales en corteza:

 - Desde la capa I a la capa V.

 - De la capa VI.

- Resumen de distribución de los tipos neuronales.

- Distribución de las neuronas con sintasa del óxido nítrico en la corteza.

- Relación de las neuronas con sintasa del óxido nítrico con los vasos sanguíneos.

Resultados

En primer lugar realizaremos la descripción de los resultados obtenidos en los animales fijados con paraformaldehído. A continuación, efectuaremos la comparación con los resultados obtenidos en los animales fijados con glutaraldehído.

3.1.1.-Descripción del patrón de distribución del neuropilo en las diferentes áreas.

La corteza cerebral se caracteriza por presentar un neuropilo que se distribuye de manera diferente según las capas y las áreas analizadas (Fig. 1-2).

En la capa I es constante el hecho de la presencia de un marcaje mínimo del neuropilo. Esta circunstancia también la podemos observar en la capa VI, aunque relativamente sea más intenso que en aquella. En las áreas más caudales (occipitales, temporales...), la zona más cercana a la sustancia blanca posee un neuropilo más marcado que el resto de las capas. Por otro lado suele presentar alguna neurona y alguna célula glial levemente marcadas, sin que lleguemos a observar prolongaciones dendríticas (Fig. 1-8).

En una secuencia rostro-caudal observamos que las regiones antero-mediales -las **áreas cingulares** (Cg)- presentan características diferenciales que afectan especialmente a la capa II: en todas ellas el neuropilo se marca tan intensamente que remarca los cuerpos neuronales que no han reaccionado con la NADPH-d.

Además las áreas Cg_2 y Cg_3 (Fig 14-15) presentan en la capa V, en su límite con la capa VI, un neuropilo igualmente intenso. Esta situación es incluso más evidente en el área Cg_3 (Fig. 14) donde ocupa toda su longitud, que en Cg_2 (Fig. 15), donde se va perdiendo a medida que nos acercamos a su límite con Cg_1 (Fig 16). Por su parte, la capa IV presenta un neuropilo suavemente marcado, que en su límite con la capa II es algo más intenso (Fig. 1-3; 14-16).

En las **áreas frontales** (Fr) no se pueden describir diferencias significativas entre las diversas capas ni entre las distintas áreas. Las capas poseen un neuropilo marcado, aunque no con la suficiente intensidad como para poder remarcar los cuerpos neuronales. A pesar de esto, algunas zonas del área frontal 2 (Fr_2) presentan una mayor intensidad en las capas II/IV -principalmente en la IV- que en el resto, pero sin llegar a lo observado en las áreas cingulares. Mantienen, en general, una intensidad homogénea en su neuropilo a lo largo de sus capas (Fig. 1-3).

Por su parte, las **áreas motoras de las extremidades** (HL y FL) nos muestran algunas zonas en las que el neuropilo de la capa IV presenta mayor intensidad que en las capas adyacentes (Fig. 17).

Las **áreas parietales** (Par) presentan importantes diferencias en el marcaje del neuropilo de la capa IV (fig. 1-6):

Resultados

a.-En **Par₁**, el neuropilo presenta dos tipos de distribución: en las zonas mediales presentan pequeños tramos con mayor intensidad que se alternan con otros de menor intensidad, es la *región de los "barrell"*; en las zonas más laterales se pierde esta alternancia, manteniéndose de forma constante más intenso que en el resto de las capas (Fig. 18).

b.-En **Par₂** el neuropilo adopta un aspecto similar a las zonas laterales del área **Par₁** y, a medida que alcanzamos sus zonas más caudales, evidenciamos además un aumento de la intensidad en las capas II/III (Fig. 19).

El **área gustativa (Gu)**, así como el resto de las áreas que mantienen relación con la cisura rhinalis (áreas de la corteza insular agranular y la perirhinal), presenta un intenso marcaje en sus capas II/III -de los más intensos que observamos en toda la corteza-, circunstancia que también se presenta en la capa VI. Además la zona del área gustativa que limita con las áreas parietales mantiene un marcaje más intenso en la capa IV profunda (Fig. 1-8 y 20).

Las **áreas retroespleniales (RS)** presentan diferencias en las capas II/III: la granular es la que presenta un neuropilo más intenso. No ocurre lo mismo en la agranular que es más homogénea, es decir, no presenta diferencias significativas entre las distintas capas (Fig 4-8; 21-22).

Analizando las regiones posteriores -las cortezas visual y auditiva principalmente- se pueden observar diferencias a nivel de las capas II/III según el área estudiada. En la **corteza visual** (Oc) el comportamiento es el siguiente: las áreas Oc₂ (Fig. 23,25), tanto la mediomedial (Oc_{2MM}) y la mediolateral (Oc_{2ML}) como la lateral (Oc_{2L}) (Fig. 25), presentan un neuropilo intenso -más evidente en las áreas Oc_{2MM} y Oc_{2ML}-. Por su parte las áreas Oc₁ (la monocular y la binocular) no presentan este tipo de marcaje. Por otro lado, podemos observar que el área Oc_{2L} presenta una capa IV más marcada que el resto de las áreas occipitales (Fig. 7-8).

La **corteza auditiva** (Te), en toda su extensión, presenta una capa II con un neuropilo tan intensamente marcado que nos permite observar los cuerpos neuronales que no han reaccionado con la NADPH-d; situación que se repite en la capa VI, aunque no con tanta intensidad. Como diferencia significativa entre las áreas temporales debemos destacar que, en el área Te₁, la capa IV -en su límite con la capa V- presenta una mayor intensidad que las capas vecinas (Fig. 26-27).

3.1.2.-Tipos neuronales.

Morfológicamente las neuronas con sintasa del óxido nítrico son mayoritariamente neuronas no-piramidales y no espinosas, aunque esporádicamente existen algunas piramidales. En la descripción de las no-piramidales seguimos la clasificación adoptada por Feldman y Peters (1978), Peters y Regidor (1981) y la

Resultados

propuesta por Fairén, De Felipe y Regidor (1984), aunque con las limitaciones propias de la técnica y del grosor del corte.

3.1.2.1.-De la capa I a la V.

No-piramidales

Bipolares.

En general, este tipo neuronal presenta un soma de pequeño o mediano tamaño generalmente fusiforme, aunque a veces puede presentar una forma algo más globosa (Fig. 31-42).

Sin incluir a las atípicas, es el tipo celular que en menor cantidad se presenta, sin ser por ello poco numerosas y de ellas, son las de orientación horizontal las menos numerosas.

De los extremos del soma surgen dos troncos dendríticos enfrentados entre sí, que pueden presentar desde muchas ramificaciones (Fig. 36,37,39,40,42) hasta incluso, en algunos casos, carecer casi por completo de ellas (Fig. 31-35, 38, 41). Las ramificaciones surgen principalmente de los extremos de los troncos, nunca junto al soma, y generalmente lo hacen en ángulo agudo (Fig. 31-42).

La orientación de su árbol dendrítico puede presentarse de dos formas con respecto a la piamadre: horizontal (Fig. 31-34) o vertical (Fig. 35-42).

Generalmente, las horizontales son neuronas de pequeño tamaño, con una ubicación preferente en las capas II/III, que presentan un soma fusiforme y escaso número de ramificaciones (Fig. 31, 33, 34).

Las que poseen una orientación vertical tienen una mayor frecuencia de presentación. Son neuronas de mediano o de pequeño tamaño. No se presentan en la capa I. Aunque pueden observarse en el resto de las capas, predominan en la capa IV (Fig. 36-38) y presentan una menor proporción en la capa II (Fig. 35). Poseen somas globosos (Fig. 35-36) y presentan un alto número de ramificaciones (Fig. 36-37), a veces desarrollado a partir de un único tronco dendrítico (Fig. 39-40). Algunas de ellas presentan cuerpos irregulares (Fig. 41-42) y escasas ramificaciones dendríticas (Fig. 41).

Bipenachadas.

En general, el soma es de mediano tamaño y con aspecto fusiforme, (Fig. 44, 47, 48) aunque a veces es algo más redondeado (Fig. 45-46) e incluso puede ser irregular (Fig. 49-50). Está situado en la zona central y de él surgen dos troncos dendríticos enfrentados entre sí que habitualmente se ramifican precozmente junto

Resultados

al soma (Fig. 43-52). A veces, uno de los troncos dendríticos se bifurca en otros dos de los que surge la arborización dendrítica (Fig. 46), aunque este hecho también lo podemos observar en los dos extremos celulares al mismo tiempo (Fig. 45). En general, el tronco no bifurcado desarrolla un árbol poco frondoso (Fig. 46). Por último y de forma menos habitual uno de los troncos dendríticos se comporta casi como el de una bipolar -poco ramificado- mientras el otro presenta una amplia ramificación (Fig. 43-47).

Las neuronas pueden presentar una orientación horizontal (Fig. 43-44 y 50) o vertical (Fig. 45-49; 51-52) con respecto a la piamadre, tanto en lo que respecta al soma como al árbol dendrítico.

Su proporción es mayor que la del tipo bipolar y se presentan en número similar a las multipolares.

Las que se presentan con una orientación horizontal son menos numerosas. Su soma es, casi exclusivamente, de mediano tamaño y se pueden ver en las capas II/III y en los límites V/VI, aunque son relativamente más abundantes en las capas II/III. También las encontramos en la capa I en la que, las pocas células que aparecen, son en gran medida de este tipo.

Las de orientación vertical presentan un soma de mediano tamaño, aunque también se ven de pequeño o gran tamaño -esto último en menor medida-. Fueron junto con las multipolares (estrelladas) las que localizamos con mayor frecuencia. Se pueden ver en todas las capas, exceptuando la capa I, y son muy abundantes en la capa IV. En este tipo neuronal es muy frecuente que el tronco dendrítico más ramificado sea el basal, sin que podamos excluir la presentación de la situación inversa.

Multipolares.

Son tan frecuentes como las bipenachadas representando ambas los tipos predominantes en la corteza cerebral.

Entre ellas se pueden considerar dos subtipos:

- Multipolares (Estrelladas)
- En forma de T o de Y

Multipolares (Estrelladas).

Son, de este grupo, las más numerosas y, junto con las bipenachadas verticales, las más frecuentes de la corteza. Se distribuyen por todas las capas

Resultados

incluyendo la capa I, donde vemos preferentemente este tipo neuronal junto a las bipenachadas que adoptan una orientación horizontal.

Son neuronas con un soma preferentemente redondeado y globoso (Fig. 53-54; 59-60; 63-64), aunque existen también somas poligonales (Fig. 55-56) o algo fusiformes (Fig. 57-58; 61-62; 65-66) e incluso de forma irregular (Fig. 67-68; 71-72) o de media luna (Fig. 69-70), de cuya superficie salen troncos- dendríticos en todas las direcciones del espacio; en el caso de los somas poligonales, los troncos dendríticos surgen de los vértices de los mismos (Fig. 53-72). Las ramificaciones nacen cercanas al soma, tanto en ángulo agudo como recto. A veces presentan una predisposición hacia la orientación vertical (Fig. 65-68) o hacia la orientación horizontal (Fig. 57-64), siempre con respecto a la piamadre. Cuando estas ramificaciones se abren de igual manera en todas las direcciones, formando una estrella y manteniendo un soma globoso, es cuando las denominamos multipolares claramente estrelladas (Fig. 53-54).

En forma de T o de Y.

Conforman un grupo poco numeroso, relativamente menor que el resto de los tipos neuronales. Se pueden observar preferentemente en las capas III, IV y V.

Son neuronas que presentan un soma triangular y tres troncos dendríticos: el soma adquiere la forma de un triángulo, a veces algo redondeado (Fig. 73-74; 77-78; 80), o algo cuadrangular (Fig. 75, 76, 79), de cuyos vértices surgen los troncos dendríticos que se dirigen tanto hacia la superficie como hacia la profundidad de la corteza; de ahí el nombre de en **forma de T** (Fig. 74, 77, 78, 80) o **Y** (Fig. 73, 75, 76, 79), dependiendo de lo horizontales u oblicuos que sean sus troncos apicales. Es frecuente observar como uno de los troncos -generalmente el basal (Fig. 73, 75, 76)- desarrolla un árbol dendrítico más frondoso que los desarrollados por los otros dos (Fig. 80).

Son neuronas de mediano tamaño, incluso a veces de gran tamaño, que habitualmente se orientan en forma de "T o Y" con respecto a la piamadre, aunque a veces su situación está algo rotada con respecto a la misma (Fig. 79).

Atípicas.

Son neuronas no muy numerosas que podemos encontrar en cualquier capa, excepto en la capa I, sin predominio en ninguna de ellas. No son clasificables dentro de los tipos morfológicos anteriormente descritos.

Destacan por poseer un soma alargado (Fig. 81-84) de contorno irregular (Fig. 81-86) que a veces se prolonga en el interior del origen dendrítico (Fig. 81-82).

Resultados

Algunas tienen cuerpos con prolongaciones somáticas (Fig. 85-86). Son de dimensiones relativamente grandes en relación a su árbol dendrítico, que es irregular y pobre en ramificaciones (Fig. 81-86).

Pueden presentar orientaciones verticales (Fig. 81-82; 85-86) u horizontales (Fig. 83-84) con respecto a la piamadre.

Piramidales

Observamos neuronas piramidales de mediano tamaño marcadas en su totalidad. Se encuentran de forma esporádica y carecen de un predominio determinado por zonas, por capas o por áreas (Fig 87-88).

3.1.2.2.-Capa VI y sustancia blanca.

La capa VI.

En esta capa podemos distinguir dos zonas según la proximidad a la sustancia blanca: una zona de menor grosor cercana a la misma, y por tanto profunda (VI_b), y otra de mayor espesor y más distante, es decir, superficial (VI_a).

La distribución de los tipos neuronales en esta capa depende de la zona observada: dada la amplitud que ocupan se puede decir que, relativamente, la zona profunda posee una mayor cantidad de neuronas con la sintasa del óxido nítrico.

Analizando la capa VI_a, podemos observar que los tipos presentes son los ya descritos, e identificamos cualquiera de ellos. Existe un predominio de los tipos multipolares -ambos subtipos (Fig. 117-120)- y las bipenachadas verticales (Fig. 121-124), aunque también son abundantes las bipolares verticales (Fig. 126-127). Por el contrario, son poco frecuentes las bipolares (Fig. 128) y las bipenachadas horizontales (Fig. 125). Además, se observan de igual forma neuronas atípicas (Fig. 130-132) y alguna piramidal (Fig. 129).

Las neuronas de esta capa son de mediano o pequeño tamaño, con un soma que va perdiendo las formas descritas como típicas para adquirir un aspecto más irregular y amorfo, aunque en todo momento mantienen un aspecto "algo globoso" (Fig. 117-132). Las observamos preferentemente en las áreas más posteriores y laterales -temporales-.

El árbol dendrítico se horizontaliza, preferentemente en las multipolares (Fig. 117-118).

Resultados

En la capa VI_b las neuronas tienen un aspecto muy irregular pudiendo considerarse atípicas aunque a veces, dentro de esa irregularidad, podemos incluirlas dentro de los tipos morfológicos habituales (Fig 133-142). Son alargadas con un contorno somático irregular, y poseen un árbol dendrítico muy pobre en ramificaciones, aunque algunos casos presentan una amplia arborización (Fig. 137-142).

Los troncos dendríticos generalmente nacen de los extremos del soma, ésto hace que podamos incluirlas dentro del tipo de las bipenachadas (Fig. 137-139) o de las bipolares (Fig. 140-142) con una orientación generalmente paralela a la piamadre (Fig. 139-142); también encontramos neuronas en las que los troncos dendríticos surgen de cualquier punto de la superficie del soma, intentando mantener una orientación horizontal, por lo que las podemos incluir dentro de las multipolares (Fig. 133-134). Aquellas que mantienen una orientación vertical poseen un soma algo más globoso. Se sitúan muy próximas a la sustancia blanca en relación con las neuronas de esta estructura (Fig. 135, 141, 143).

Sustancia blanca.

El estudio de la sustancia blanca demostró la existencia de neuronas que expresaban la sintasa del óxido nítrico (Fig. 143-156).

Dichas neuronas se presentan en distinta proporción según la zona de sustancia blanca estudiada.

Cápsula externa.

En ella las neuronas se distribuyen a todo lo largo de su recorrido, disminuyendo en número a medida que nos desplazamos caudalmente.

La cantidad de neuronas no es elevada y mayoritariamente se sitúan en las zonas más superficiales, en contacto con la corteza.

Se distribuyen de forma aislada aunque con frecuencia se agrupan -4 ó 5 neuronas- cerca de la corteza (Fig. 143-144 y 146), situación que coincide habitualmente con la presencia de neuronas en la capa VI_b.

Son proporcionalmente más abundantes en las zonas rostrales. Con frecuencia adoptan una distribución lineal (tanto vertical como horizontalmente) con respecto a la superficie de la sustancia blanca (Fig. 143-144).

Aunque se sitúan mayoritariamente en los lugares descritos, también se observan en los límites con el núcleo "estriado", con el "cingulum" y con el

Resultados

"alveus", aunque en estos casos no hemos podido demostrar la existencia de agrupaciones neuronales.

Los tipos que encontramos en esta zona pertenecen predominantemente a las bipenachadas, presentan cuerpos fusiformes y fuertemente aplanados, de orientación paralela a los tractos de fibras mielínicas (Fig. 145, 147, 148, 152); también se observan multipolares estrelladas que mantienen un cuerpo globoso (Fig. 149, 150, 153), aunque algo irregulares en su superficie, y algunas bipolares que presentan somas muy aplanados, situados entre los haces mielínicos (Fig. 144-151); además se pueden observar algunas neuronas atípicas (Fig. 146). Señalaremos que ninguno de los tipos presenta un elevado número de ramificaciones dendríticas (Fig. 143-153).

Generalmente estas neuronas se orientan paralelamente a la piamadre (Fig. 143-145; 147-148; 151-153), y en menor proporción lo hacen ortogonalmente a ella (Fig. 153). Estas últimas se sitúan mayoritariamente en la zona de la sustancia blanca que se encuentra junto a las porciones más rostrales de la corteza insular agranular posterior.

Incluso las neuronas que son clasificables en algunos de los tipos morfológicos habituales adoptan un aspecto bastante irregular. Las neuronas

descritas como atípicas se sitúan, con preferencia, en la zona que limita con la corteza (capa VI_b).

Cingulum.

En esta formación, las neuronas con la sintasa del óxido nítrico se sitúan en los límites con el cuerpo calloso y la corteza.

El tipo neuronal predominante es el de las bipenachadas verticales con escasa cantidad de ramificaciones dendríticas (Fig. 154).

Comisura blanca anterior.

Como norma no encontramos neuronas, aunque a veces aparece alguna estrellada con unos árboles dendríticos arrosariados (Fig. 155).

Cuerpo calloso.

Se puede observar esta clase neuronal distribuída de forma aislada en toda su longitud. Los tipos observados son las bipolares y las bipenachadas: en ambos casos presentan cuerpos alargados y aplanados dispuestos entre los haces de fibras mielínicas (Fig. 156).

Resultados

3.1.3.-Agrupaciones neuronales en la corteza.

3.1.3.1.- De la capa I a la V.

A pesar de que la mayoría de las neuronas con sintasa del óxido nítrico se distribuyen a todo lo largo de la corteza cerebral de manera aislada, con cierta frecuencia podemos ver algunos grupos neuronales, cuyos componentes no se corresponden, en su totalidad, con algún tipo morfológico específico (Fig. 160-167).

Estos grupos neuronales se sitúan en general en las capas II/III (Fig. 160-161; 163-166) y en la capa IV (Fig. 162, 167).

A veces, los grupos neuronales de capas II/III también ocupan parte de la capa IV (Fig. 162), formando grupos de hasta 6 neuronas, de mediano y pequeño tamaño, que no coinciden mayoritariamente con tipos neuronales específicos. Habitualmente existen dentro del grupo 2 ó 3 neuronas del mismo tipo, entre las que predominan las bipenachadas (Fig. 164-165) o las multipolares (Fig. 160) y, raramente, las atípicas.

Se pueden observar "**agrupaciones**" de grupos, es decir, dos o tres grupos como los ya descritos que están próximos entre sí. Lo habitual es encontrar este

tipo de "superagrupación" en las capas II/III y IV, aunque también se observa entre grupos de capas II/III y grupos de capa VI (Fig. 168).

Otro tipo de grupo, aunque menos numeroso, es el constituido por 2 ó 3 neuronas, a veces alguna más, que se alinean en la misma capa o en capas adyacentes (Fig. 164-167). Según la orientación y el número de las células alineadas, estas agrupaciones ocupan una o varias capas: mayoritariamente se sitúan en las capas II/III o, con menor frecuencia, en la capa IV. Otras veces abarcan todas las capas o casi todas -II a VI_a-. El tipo neuronal que participa en la formación de estos grupos no siempre es el mismo, aunque es frecuente que se repitan los tipos celulares dentro del mismo grupo.

3.1.3.2.-De la capa VI.

A las neuronas de la capa VI las encontramos mayoritariamente de forma aislada, aunque tampoco es extraño encontrar grupos celulares que adoptan un patrón distinto según la profundidad en la que los encontramos.

En la capa VI_a no existe predominancia de tipo neuronal alguno y el número de células que forman el grupo es escaso (3-4 neuronas). A veces el mismo grupo posee una tipología similar con un predominio de las bipenachadas verticales (Fig. 170-171).

Resultados

Los grupos neuronales de la capa VI_b poseen un número poco elevado de neuronas -de 2 a 4- que con frecuencia son atípicas. Con cierta frecuencia se relacionan con pequeños grupos -2 ó 3 neuronas- de la sustancia blanca que, además, suelen ser atípicas también. Tanto las células de la capa VI como las de la sustancia blanca presentan una arborización horizontal, hecho que es más acentuado en las neuronas de la sustancia blanca (Fig. 172-175).

En otros casos, los grupos de la capa VI_b están relacionados con otros grupos de la capa VI_a por medio de neuronas aisladas o formando un gran grupo (Fig. 169).

Los grupos de la capa VI_a no sólo se relacionan con los de la capa VI_b, como ya hemos comentado, sino que además lo hacen con los grupos de las capas superficiales por medio de neuronas aisladas (Fig. 168).

3.1.4.-Resumen de la distribución de los tipos neuronales.

Hemos realizado un estudio antero-posterior de la corteza cerebral en el que analizamos la distribución de las neuronas observadas en cada una de sus capas.

3.1.4.1.-Capa I.

Como ya hemos comentado, la cantidad de neuronas en esta capa es baja. Las pocas neuronas observadas se engloban dentro de los tipos multipolar y bipenachado y, en ambos casos, desarrollan un árbol dendrítico que adopta una orientación horizontal con respecto a la piamadre; algunas ramificaciones dendríticas profundizan hacia las capas vecinas.

Son de pequeño o mediano tamaño con somas algo globosos, o alargados, dispuestos paralelamente a la piamadre.

3.1.4.2.-Capa II.

Es una de las capas que presenta una mayor cantidad de neuronas, en las que es evidente un predominio del tipo multipolar, aunque existen también gran número de bipenachadas.

Las multipolares son preferentemente de mediano o de gran tamaño. Las de mayor tamaño predominan en las áreas posteriores -occipitales-. El desarrollo de su árbol dendrítico presenta con frecuencia una orientación horizontal con respecto a la piamadre.

Resultados

El soma de las multipolares es fundamentalmente globoso, sobre todo en las áreas temporales y occipitales aunque también se observa en las áreas cingulares y frontales; en las áreas parietales, a veces, los somas se alargan y adquieren un aspecto más fusiforme.

Las multipolares en "T o Y" son de mediano o de gran tamaño y se presentan de forma esporádica en esta capa.

Dentro de las neuronas bipenachadas predominan las que poseen una orientación, tanto del árbol dendrítico como del soma neuronal, vertical con respecto a la piamadre. A pesar de ello, también se observan algunas neuronas que presentan orientación horizontal.

Las áreas donde predominan la neuronas bipenachadas son las parietales, preferentemente en los cortes más rostrales.

Las neuronas bipenachadas de esta capa presentan un cuerpo bastante globoso, aunque no llegan a perder su aspecto fusiforme.

También podemos observar neuronas bipolares orientadas tanto vertical como horizontalmente: las horizontales, que son las más frecuentes, poseen un soma pequeño y fusiforme, con largas prolongaciones dendríticas, aunque a veces

sus somas son algo más globosos. Las verticales tienen mayor cantidad de ramificaciones, un soma más globoso y presentan preferencia por las áreas parietales.

Por último se observan, aunque en escasa proporción, neuronas atípicas de mediano o pequeño tamaño, sin un predominio claro por ningún área y con una disposición preferentemente horizontal. Tampoco es frecuente encontrar piramidales en esta capa.

3.1.4.3.-Capa III.

Posee un elevado número de multipolares, siendo el tipo predominante. Las multipolares de las áreas cingulares y retrospleniales poseen un soma grande y algo globoso, sin que el árbol dendrítico adopte un aspecto estrellado.

En las áreas parietales este tipo neuronal es de mediano tamaño y presenta una morfología muy variada -algunas tienen los cuerpos globosos, otras alargado o irregular-; no existe predominio en la orientación del árbol dendrítico. En esta capa es donde las "T o Y" alcanzan un mayor diámetro.

En las regiones posteriores -occipitales y temporales- estas neuronas son de mediano o de gran tamaño, con un soma globoso y presentan, con frecuencia, un

Resultados

árbol dendrítico ampliamente desarrollado y orientado horizontalmente con respecto a la piamadre. Son las de las áreas occipitales las que presentan un mayor tamaño. Las multipolares en "T" son algo más grandes y presentan un tronco dendrítico más desarrollado, preferentemente el basal.

Otro tipo que se encuentra de forma abundante es el de las neuronas bipenachadas. Son más frecuentes en las regiones intermedias -se exceptúan los polos frontal y occipital-. Por lo general, adoptan una disposición vertical y mantienen un aspecto globoso en la mayoría de los casos, aunque a veces presentan algunos somas con formas bastante irregulares. Las de aspecto globoso son más frecuentes en las áreas posteriores -occipitales-.

El soma fusiforme típico de este tipo neuronal es más evidente en las áreas temporales (auditivas), sin que por ello dejemos de observar algunas de aspecto más globoso.

Las bipolares son poco numerosas y poseen un soma pequeño, generalmente muy alargado. Su árbol dendrítico está poco ramificado. Las podemos observar principalmente en las áreas parietales y auditivas y son muy escasas en las occipitales.

Por su parte, las atípicas mantienen las características ya descritas para este tipo neuronal. Son más abundantes que en la capa II y se sitúan preferentemente en las proximidades de la capa IV. Predominan en las áreas posteriores - occipitales y temporales-.

También encontramos, aunque de forma esporádica, algunas piramidales de mediano tamaño.

3.1.4.4.-Capa IV.

El tipo predominante en esta capa es el de las bipenachadas, de mediano o pequeño tamaño y con una orientación preferentemente vertical. Su soma es bastante globoso, aunque a veces es irregular. Aunque es raro observarlas en las capas superficiales de las áreas occipitales, empiezan a ser detectadas en los límites III/IV y, a medida que profundizamos, llegan incluso a ser más frecuentes que las multipolares.

En las áreas temporales adoptan una morfología claramente fusiforme y son generalmente más pequeñas, circunstancia que también observamos en las áreas parietales.

Resultados

Las que presentan una orientación horizontal son más pequeñas y poseen un cuerpo más fusiforme.

El tipo multipolar presente en esta capa no es del tipo descrito como estrellado, por el contrario, son de mediano o pequeño tamaño, poseen un soma irregular o algo globoso y sus troncos dendríticos no se distribuyen homogéneamente en todas las direcciones del espacio. Además se observan algunas neuronas en "T o Y" de mediano tamaño, con una dendrita basal más desarrollada, carentes de una predisposición por alguna de las áreas.

Las bipolares encontradas adoptan una orientación vertical, sin un predominio evidente por algún área, aunque son más escasas en las áreas anteriores. Son de pequeño o de mediano tamaño, con un cuerpo fusiforme o globoso y con muy pocas ramificaciones dendríticas.

Las atípicas y las piramidales son muy escasas.

3.1.4.5.-Capa V.

En esta capa no existe una clara predominancia de un tipo neuronal: son más abundantes las bipenachadas y las multipolares que las bipolares y las atípicas, aunque las bipolares también se presentan en número elevado.

Ya en los límites IV/V observamos una cierta igualdad numérica entre bipenachadas y multipolares, aunque las bipenachadas parecen presentarse en mayor número. Poseen un soma de mediano o pequeño tamaño que mantiene un aspecto fusiforme dentro de las frecuentes irregularidades que presentan. Es en las áreas posteriores -occipitales y temporales- donde su tamaño es menor. Mayoritariamente presentan una arborización vertical.

Generalmente las bipolares adoptan una disposición vertical, aunque también observamos con cierta frecuencia orientaciones horizontales. Son neuronas con somas pequeños y largas prolongaciones; ésto es más evidente en las horizontales ya que las verticales, a veces, presentan somas mayores y más globosos.

Las atípicas son más abundantes en esta capa que en las anteriores. Su arborización se asemeja a la observada en las bipenachadas o en las multipolares, y presentan cierta tendencia a la horizontalidad.

Piramidales de mediano o pequeño tamaño pueden ser observadas de forma esporádica en las diferentes áreas.

En algunos casos, las zonas profundas de la capa V comienzan a tener características parecidas a la capa limítrofe -IV-: presenta neuronas de mediano o pequeño tamaño, con un soma irregular y con un árbol dendrítico de disposición

Resultados

más horizontal. Este cambio de orientación es más evidente en las multipolares que en las bivenachadas, entre las que aún observamos un gran número de neuronas dispuestas verticalmente.

Y en lo referente a los porcentajes relativos por áreas hemos encontrado la siguiente relación:

tipos neuronales (medias de %)				
área	Bivenachada	Bipolar	Multipolar	Atípica
cingular	34	11	37	18
retroesplenial	36	05	33	26
frontal	37	12	34	16
motora	38	20	32	20
somestésica	35	17	28	20
visual	40	11	28	20
auditiva	40	10	30	22
insular dorsal	40	14	29	16

3.1.5.-Distribución de las neuronas con sintasa del óxido nítrico en la corteza.

Tras un exhaustivo estudio se comprobó, con la ayuda de todos los dibujos realizados, la existencia de neuronas que mostraban la presencia de la sintasa del óxido nítrico a lo largo de toda la corteza cerebral con la excepción de la región correspondiente al "indusium griseum" (Fig. 184).

Estas neuronas presentan una distribución laminar y, en general, las podemos encontrar situadas desde la capa I hasta la capa VI. En cuanto a la densidad relativa por capas observamos que no es homogénea: en la capa I la cantidad de células que se puede encontrar es mínima, dos o tres por cada animal, mientras que las capas II y III, en conjunto, junto con la capa VI (ésta última en menor medida) son las capas que presentan una mayor cantidad de células. También se observan neuronas en las capas IV y V, aunque en menor cantidad (Fig. 184).

Realizando un análisis por regiones comprobamos que, en todas ellas, podemos ver como esta clase de neuronas se distribuye sin adoptar en ningún momento un patrón de distribución específico, aunque podemos destacar una serie de detalles. Entre ellos es interesante mencionar que, en todas las regiones, hemos observado espacios desprovistos de neuronas marcadas con sintasa del óxido

Resultados

nítrico, aunque posean un neuropilo marcado con la NADPH-diaforasa (Fig. 185-189).

Estos espacios, además de encontrarse en todas las regiones, abarcan todo el espesor de la corteza (van desde la piamadre hasta la sustancia blanca). El área cortical que ocupan varía de unos a otros sin que podamos establecer un patrón comparativo en cuanto a amplitud ni a localización topográfica específica.

Haciendo un estudio rostro-caudal de la topografía de dichos espacios observamos que la distancia que existe entre ellos es mayor en los cortes más rostrales que en los más caudales (Fig. 185-189).

En la corteza frontal estos espacios están más distanciados entre sí que en la corteza occipital. En Fr_2 es habitual encontrar de 2 a 3, aunque a veces es único. Es frecuente encontrarlos en los límites de las áreas Fr_2 y Fr_1 , aunque en esta última en menor frecuencia.

La corteza parietal presenta abundantes espacios que, a medida que nos trasladamos más caudalmente, están más próximos entre sí (Fig. 185-187).

En la parte dorsal de la corteza insular agranular se observa la existencia, en general, de un solo espacio aunque más rostralmente se puedan ver varios (Fig. 186).

En la corteza retrosplenial las áreas ocupadas por los espacios son muy amplias y la ocupan casi por completo, circunstancia que es más evidente en la región granular que en la agranular (Fig. 187-188).

En las regiones occipitales, aunque sean de poca amplitud, están más próximos entre sí (Fig. 188).

3.1.6.-Relación de las neuronas con la sintasa del óxido nítrico con los vasos sanguíneos.

Dentro del conjunto de neuronas con la sintasa del óxido nítrico destacamos un grupo que se sitúa en estrecha relación con los vasos sanguíneos: situadas junto a ellos, llegan a deformar sus somas para mantener un mayor contacto con los mismos (Fig. 192-193; 196-197; 201, 204, 207-208). Sus prolongaciones dendríticas siguen el curso del vaso o lo abrazan (Fig. 192-194; 196-200; 205-208). Además, no es extraño encontrarlas situadas en las bifurcaciones vasculares o en las inmediaciones de las mismas (Fig. 196-198; 203).

Resultados

Mayoritariamente se encuentran dentro de los tipos bipenachado (Fig. 192-195) y multipolar (Fig. 196-199; 203), con cierto predominio por éste último, sin que dejemos de observar otros tipos neuronales (Fig. 200-202). Los somas generalmente son irregulares, para adaptarse al vaso, aunque también se pueden observar somas globosos y fusiformes (Fig. 192-210).

La cantidad de células es mayor en las capas más superficiales -capas II/III y IV- y se presentan en mayor proporción en las áreas frontales y parietales que en las occipitales y temporales.

Las capas V y VI no tienen una evidente predisposición por estas neuronas y se presentan sobre todo en las áreas frontales y parietales.

También podemos encontrar grupos celulares cercanos a los vasos donde algunas de las células que los componen poseen una relación directa con el vaso sanguíneo (Fig. 209-210).

3.1.7.-Datos obtenidos con la fijación con glutaraldehído.

En este apartado analizamos la distribución y la tipología de las neuronas con la sintasa del óxido nítrico y las comparamos con las observadas en los animales fijados con paraformaldehído.

Una vez realizados estos estudios, no se pudieron demostrar diferencias apreciables en lo referente a las neuronas no-piramidales que se presentan en estos animales.

En relación a las neuronas piramidales observadas en estos animales pudimos demostrar dos tipos de marcaje:

- 1.-El que se presenta en los fijados con paraformaldehído sin que se presente diferencia alguna ni en distribución ni en morfología.
- 2.-El que afecta exclusivamente al soma neuronal.

Las neuronas con marcaje exclusivamente en el soma, se pueden encontrar adoptando simultáneamente dos tipos de distribución: uno, más frecuente y homogéneo, en relación a las capas, y otro, más raro en estos animales, en el que las neuronas además forman columnas.

2.1.-Distribución homogénea: nos referimos a la posibilidad de encontrar a estas neuronas ocupando la totalidad del espesor de una única capa (dorso-ventralmente). Esta distribución afecta fundamentalmente a las capas VI y IV.

Resultados

2.2.-Distribución en columnas: son los espacios de corteza donde las capas son ocupadas de manera consecutiva por estas neuronas piramidales, es decir, si en el mismo espacio de corteza las observamos en las capas VI y IV y no en la capa intermedia (capa V) no se puede considerar una columna.

En cuanto a la distribución homogénea (por capas) constatamos que la proporción de estas neuronas piramidales varía según las capas. Así, se observa que, la capa I no las presenta en ninguna de las áreas de la corteza cerebral de estos animales. En las capas II/III solo se observan en determinadas zonas, sin que alcancen una proporción muy elevada. La capa IV presenta una proporción considerable de piramidales con marcaje sólo en el soma. Nos queda comentar la capa V donde la cantidad de neuronas es escasa y en la que las células son de mediano tamaño.

El comportamiento de la capa VI depende de si hablamos de la zona superficial, donde el número es elevado con somas neuronales de mediano tamaño y bien delimitados, o de la zona profunda, donde son escasas y de pequeño tamaño. También se observa la existencia de glía a este nivel.

Analizando la situación rostro-caudalmente veremos que, a medida que nos trasladamos caudalmente, en la capa VI_b se va perdiendo progresivamente la presencia de estas neuronas piramidales que incluso, a veces, llegan a desaparecer.

También en las zonas más caudales va disminuyendo el número de estas neuronas piramidales en todas las capas, con la excepción de las zonas con columnas, cuya estructura y localización serán comentados más adelante.

Haciendo un seguimiento medio-lateral al mismo tiempo que rostro-caudal observamos que, rostralmente, la corteza cingular no evidencia el marcaje de estas neuronas y, más caudalmente, la corteza retrosplenial tampoco presenta estas neuronas en ninguna de sus capas.

También podemos observar este tipo celular en el claustrum.

Por otro lado, encontramos un tipo de "marcaje negativo" en una buena parte de las áreas en las que no podemos observar somas neuronales marcados: el neuropilo, intensamente marcado, delimita huecos que adoptan la forma de los somas de las neuronas piramidales. Este marcaje negativo afecta fundamentalmente a las capas II/IV de las áreas dorso-mediales de los cortes rostrales (corteza cingular, área infralímbica de la corteza frontal medial y corteza peduncular dorsal); también es muy evidente en las capas II/III de las áreas centradas alrededor de la cisura rinal, a todo lo largo de su desarrollo longitudinal.

Resultados

En referencia a las columnas podemos decir que en general son zonas de corteza donde encontramos:

- 1.-Un marcaje de NADPH-diaforasa más intenso.
- 2.-Un neuropilo más evidente que en el resto de las áreas, que incluso remarca neuronas ya marcadas y evidencia somas neuronales que sin estar marcados pueden ser observados (marcaje negativo)
- 3.-Las neuronas piramidales marcadas sólo en el soma.
- 4.-Se comprueba que las no-piramidales mantienen su comportamiento típico.

La amplitud de las columnas puede variar tanto en anchura como en altura. En relación con el ancho (longitud) pueden ocupar toda una área, sólo una porción de la misma, o puede incluso continuar en el área vecina. Con respecto a la altura, que es lo mismo que decir cuantas capas ocupa, puede abarcar desde la capa VI a la V (pequeña altura) o prolongarse hasta la capa II/III (gran altura), aunque nunca alcanzan la capa I.

Los límites laterales de estas columnas suelen ser bastante nítidos (ausencia de células) aunque, a veces, hemos observado un pequeño número de células a su alrededor que no presentan disposición columnar.

La amplitud y número de estas columnas, en esta población de animales, es escasa, aunque se pueden observar preferentemente en las siguientes áreas:

1.-La **corteza gustativa**, en las que aparecen pequeñas columnas que raramente alcanzan la capa IV.

2.-La **corteza motora de las extremidades**, donde las zonas centrales de la columna suele alcanzar la parte más superficial de la capa IV. Además, en la capa II/III, el neuropilo es marcado y, en ella, se pueden evidenciar algunas neuronas piramidales marcadas.

3.-En la **corteza frontal**: las células se sitúan próximas a los límites con las áreas motoras de las extremidades y, sin ser tan altas, alcanzan la capa IV.

4.-En la **corteza occipital** existen pequeñas columnas que suben hasta los límites entre la capa V y la IV.

5.-En la **corteza temporal** de algunos animales hemos podido observar columnas que pueden alcanzar, a veces, la capa IV.

3.2.- ANIMALES VIEJOS

Fueron analizados siguiendo el mismo protocolo utilizado en la población de animales adultos y, en general, las diferencias encontradas fueron mínimas.

Resultados

3.2.1.-Descripción del patrón de distribución del neuropilo en las diferentes áreas.

Como ya hemos dicho, en ambas poblaciones se puede observar que poseen un neuropilo claramente marcado en toda la corteza. Además, su distribución puede ser diferente según las capas y el área analizada en la misma población y entre ellas (Fig. 9-13).

Hay que destacar que, con respecto a la capa I, el patrón del neuropilo es coincidente en las dos poblaciones en estudio: observamos un marcaje mínimamente intenso (Fig. 9-13; 28-30).

Siguiendo un estudio antero-posterior, encontramos que en las regiones antero-dorsales -las **áreas cingulares**- presentan unas características especiales en la capa II, con una pequeña diferencia entre las dos poblaciones: de forma habitual, en esta capa, se marca intensamente el neuropilo remarcando los cuerpos neuronales que no han reaccionado con la NADPH-d. Este hecho, que en adultos es evidente en cualquiera de las áreas cingulares, en las viejas es muy poco claro a nivel de la Cg₁ (Fig. 28). Coinciden en ambas poblaciones, sin presentar modificaciones aparentes, las características referentes a la capa V. Tampoco hemos observado diferencias apreciables en el resto de las capas de estas áreas (Fig. 9-10).

En las **áreas frontales**, las diferencias entre las dos poblaciones las encontramos a nivel de las capas II/IV de los cortes más rostrales -principalmente en la capa IV- donde los animales viejos presentan un neuropilo más marcado y con una predisposición por casi todas las áreas frontales, pero sin llegar a lo observado en las áreas cingulares. Mantienen, en general, una intensidad homogénea del neuropilo a lo largo de sus capas (Fig. 9-10).

Por su parte, las **áreas motoras de las extremidades** presentan, en ambas poblaciones, algunas zonas en la capa IV con mayor intensidad que las capas circundantes.

Las **áreas parietales** presentan los dos tipos de marcaje del neuropilo observados en la capa IV, y que ya fueron comentados para la población adulta. Así, en **Par₁**, observamos tanto la alternancia de intensidad de la zona de los "barrell", como aquella zona homogénea en intensidad de las partes más mediales del área (Fig. 10-11).

Mientras, en **Par₂**, el neuropilo adopta un aspecto similar a las zonas mediales del área **Par₁** y, a medida que alcanzamos sus zonas más caudales evidenciamos además un aumento de la intensidad en las capas II/III (Fig. 10-11).

El **área gustativa** así como todas las áreas relacionadas con la cisura rhinalis (áreas de la corteza insular agranular y la perirrinal) (Fig. 10-13) mantienen, en

Resultados

ambas poblaciones, un intenso marcaje de las capas II/III -siendo además de los más intensos que observamos en toda la corteza-, circunstancia que también se presenta en la capa VI. Estos hechos son más evidentes en los animales adultos que en los viejos. También es más significativo en los animales adultos que la zona del área gustativa, limítrofe con las áreas parietales, mantenga un marcaje más intenso en la capa IV profunda.

Las **áreas retroespleniales** presentan diferencias en el marcaje de las capas II/III, circunstancia que coincide en ambas poblaciones (Fig. 11-13).

Analizando las regiones caudales -las cortezas visual y auditiva, principalmente- se pueden observar diferencias a nivel de las capas II/III según el área estudiada, que además son diferentes según la población estudiada.

En la **corteza visual** se presentan grandes diferencias entre ambas poblaciones. Así en adultos vemos que las capas II/III presentan un neuropilo más intenso en las áreas Oc_2 , tanto la mediomedial (Oc_{2MM}) y la mediolateral (Oc_{2ML}) como la lateral (Oc_{2L}), y que las áreas Oc_1 (la monocular y la binocular) no poseen este marcaje. Mientras que en las viejas no se presentan diferencias apreciables entre la Oc_2 y la Oc_1 , no observándose en ninguna de ella un neuropilo intensamente marcado en las capas II/III (Fig. 29-30). Por otro lado se observa,

en las dos poblaciones, que el área Oc_{2L} tiene una capa IV más marcada que el resto de las áreas occipitales.

La **corteza auditiva** presenta diferencias según la población estudiada: en los adultos presentan una capa II con un neuropilo tan intensamente marcado que nos permite observar los cuerpos neuronales que no han reaccionado con la NADPH-d, circunstancia no observada en las viejas, en las que se evidencia una homogeneidad entre las capas. Las adultas también presentan una capa IV intensa, situación que en los animales viejos se observa exclusivamente en Te_1 ; hay que tener en cuenta que es ésta el área que lo presenta de forma más intensa en adultos (Fig. 12-13).

3.2.2.-Tipos neuronales.

En ambas poblaciones los tipos neuronales que distinguimos son esencialmente los mismos y observamos mayoritariamente neuronas no-piramidales y no espinosas, aunque también se observan piramidales, aunque de forma esporádica.

Resultados

Los tipos que observamos fueron los siguientes:

3.2.2.1.-De la capa I a la V.

No-piramidales.

Bipolares.

La morfología no presentó diferencias objetivables entre las poblaciones, coincidiendo con la ya descrita (Fig. 89-91).

Fue el tipo que en menor proporción se presentó. En el caso de los adultos encontramos con algo más de frecuencia las que poseen una orientación vertical que las horizontales; no sucedió así en los animales viejos, en los que no parecen existir diferencias claras.

Las bipolares horizontales (Fig. 91) se localizan en todas las capas con excepción de la capa I, aunque en las adultas las localizamos preferentemente en las capas II/III, en las viejas muestran una preferencia por la capa V, aunque no son abundantes.

Las que poseen una orientación vertical (Fig. 89-90) están ubicadas en todas las capas, con la excepción de la capa I en ambas poblaciones, y se presentan en un número variable según la capa. En las adultas se sitúan preferentemente en las capas II/III y en las viejas, además, invaden la capa IV.

Bipenachadas.

Morfológicamente no existen diferencias entre las dos poblaciones (Fig. 92).

Su proporción es, en ambas edades, mayor que la observada con las bipolares. Si comparamos su número con otros tipos neuronales, como es el caso de las multipolares (estrelladas), vemos que en las dos poblaciones la proporción es semejante.

Las bipenachadas con un árbol dendrítico horizontalizado se ubican mayoritariamente en las capas II/III en ambas poblaciones de animales, aunque en el caso de las adultas se presentan, además, en la capa I, lo que no es frecuente en las viejas.

Las que adoptan una orientación vertical (Fig. 92) son más frecuentes en ambas poblaciones, aunque esta circunstancia es más evidente en las viejas. La distribución en ambas es amplia, abarcando mayoritariamente las capas II/III,

Resultados

aunque en las viejas también son numerosas en la capa IV. Sin embargo no las pudimos observar, en ningún caso, en la capa I.

Multipolares.

En ambas poblaciones son de las más numerosas y en ellas consideramos dos subtipos.

-Multipolares (Estrelladas)

-En forma de T o Y

Multipolares (Estrelladas).

La morfología no varía entre las poblaciones estudiadas (Fig. 93-95).

Dentro del tipo de las multipolares son las más numerosas, tanto en las adultas como en las viejas. En ambas poblaciones, y junto con las bipenachadas verticales, constituye el tipo dominante en la corteza cerebral de estos animales. Se distribuyen de forma semejante por todas las capas.

En forma de T o Y.

La morfología es similar en las dos poblaciones de animales (Fig. 96).

Entre los animales adultos y los animales viejos no existen diferencias, ni en la relación con los otros tipos celulares ni en la localización. Se presentan con menor frecuencia que el resto de los tipos neuronales. Se localizan preferentemente en las capas II/III y IV.

Atípicas.

La morfología en las dos poblaciones de animales es la misma, e incluye los tipos no clasificables entre los grupos morfológicos habituales (Fig. 97).

Son neuronas que encontramos en todas las capas con la excepción de la capa I. Destacamos en el caso de las viejas que su presencia se puede considerar importante en la capa V.

Piramidales.

Lo observado en los animales adultos y viejos fue aproximadamente lo mismo, ésto es, neuronas de mediano tamaño marcadas en su totalidad con una

Resultados

presentación esporádica y sin predominio determinado ni por zonas ni por capas ni por áreas (Fig. 174).

3.2.2.2.-Capa VI y sustancia blanca.

La capa VI.

En esta capa se distinguen las mismas zonas que en los animales adultos: una zona profunda y otra superficial.

La proporción de neuronas con la sintasa del óxido nítrico según las zonas se mantiene igual que en los adultos.

Analizando la capa VI_a podemos considerar que no existen diferencias apreciables en cuanto a tipología neuronal entre ambas poblaciones de animales (Fig. 157). Sin embargo destacamos la preferencia de las bipolares verticales por presentarse en esta capa, principalmente en los animales viejos.

En la capa VI_b las neuronas tienen un aspecto muy irregular pudiendo considerarse atípicas, igual que en los animales adultos y con las mismas características.

Sustancia blanca.

En las dos poblaciones de animales se observó la presencia de las neuronas con la sintasa del óxido nítrico, que se presentan en distinta proporción según las zonas analizadas.

En proporción, estas neuronas son menos abundantes en los animales viejos.

Cápsula externa.

Es la zona de sustancia blanca donde encontramos un mayor número de neuronas con sintasa del óxido nítrico, a pesar de que en los animales viejos el número de células encontradas sea menor que en los adultos.

La distribución y localización de las neuronas se mantiene idéntica en ambas poblaciones.

Los grupos neuronales que presentan los animales viejos evidencian diferencias con los de las adultas: son más escasos y presentan un menor número de neuronas. Además, no suelen coincidir con grupos de la capa VI profunda.

Resultados

La tipología neuronal no presenta diferencias apreciables entre ambas poblaciones (Fig 158-159).

Cingulum.

La localización es aproximadamente la misma en las dos poblaciones; también coinciden los tipos neuronales observados.

Comisura blanca anterior.

En general no se encuentran las neuronas con sintasa del óxido nítrico aunque, a veces y en poca cantidad, las podemos encontrar en las áreas periféricas.

Normalmente son neuronas horizontales con poca arborización dendrítica.

Cuerpo calloso.

Se distribuyen a lo largo de toda su longitud de forma aislada. En ambas poblaciones de animales el número de neuronas no es elevado, aunque siempre es menor en los animales viejos.

La tipología neuronal coincide en las dos poblaciones -bipolares y bipeñachadas-.

3.2.3.-Agrupaciones neuronales en corteza.

3.2.3.1.-De la capa I a la V.

A pesar de que lo habitual sea una presentación aislada, tanto en la población de adultas como en la de viejas, se presentan grupos neuronales (Fig. 174).

Estos grupos, en ambas poblaciones, se localizan mayoritariamente en las capas II/III, aunque en los adultos la capa VI también presenta un abundante número de grupos neuronales.

Los grupos neuronales de las capas II/III de los animales adultos y viejos no presentan diferencias apreciables.

Tampoco se observan diferencias en los grupos que adoptan una disposición lineal ni en las "agrupaciones" de grupos.

Resultados

3.2.3.2.-De la capa VI.

Como ya comentamos en los animales adultos, las neuronas de la capa VI, y las del resto de las capas, aunque mayoritariamente las encontramos de forma aislada, tampoco es extraño encontrarlas formando grupos celulares.

Los grupos se van a diferenciar entre los encontrados en la zona superficial y los de la profunda.

Los grupos de la capa VI_a no presentan diferencias relevantes con respecto a los descritos en los animales adultos: presentan un número y comportamiento similares y se relacionan con los grupos de capas más superficiales y con los grupos de la capa VI_b mediante neuronas aisladas, como sucede en los animales adultos.

En los grupos de la capa VI_b no se aprecian diferencias claras ni en el número de neuronas -que es poco elevado- ni en la predominancia de las atípicas. Donde si se han constatado diferencias es en la relación con la sustancia blanca: la correlación con grupos neuronales de ambas estructuras, en animales viejos, es infrecuente, al contrario de lo que hemos observado en adultos (Fig. 175). Sin embargo, a veces, observamos próximos a estos grupos neuronales 1 o 2 neuronas aisladas en la sustancia blanca.

3.2.4.- Resumen de distribución de los tipos neuronales.

3.2.4.1.-Capa I.

La proporción de neuronas en esta capa, como ya hemos comentado, es baja en ambas poblaciones y aun más en las viejas.

En los dos grupos de animales observamos los mismos tipos celulares y con características sin diferencias apreciables.

3.2.4.2.-Capa II.

En ambas poblaciones esta capa es una de las de mayor proporción de neuronas, con un evidente predominio del tipo multipolar, aunque existen también gran número de bipenachadas.

En las adultas las multipolares son preferentemente de mediano o gran tamaño, mientras que en los animales viejos es extraño encontrar neuronas de gran tamaño, siendo generalmente de mediano tamaño.

Resultados

La orientación del árbol dendrítico es, en ambas poblaciones, horizontal a la piamadre, aunque en los animales viejos no es extraño encontrar multipolares estrelladas.

Las características del soma de las multipolares es fundamentalmente igual en las dos poblaciones.

Las multipolares en "T" parecen algo más abundantes y pequeñas en la población de viejas.

En lo referente a las bipenachadas el comportamiento no presenta diferencias apreciables entre las dos poblaciones.

En los animales viejos las bipolares no parecen presentar diferencias numéricas en la orientación del árbol dendrítico -número similar de células horizontales y verticales-; mientras las adultas evidencian un mayor número de bipolares horizontales.

En cuanto a las atípicas y piramidales no hay que destacar diferencias entre los dos grupos de población.

3.2.4.3.-Capa III.

Las dos poblaciones presentan un elevado número de multipolares, mientras en las adultas éste es el tipo predominante, en las viejas las bipenachas también son abundantes.

En las áreas retroespleniales y cingulares las viejas presentan muy escaso número de neuronas, aunque las multipolares que observamos tienen características similares a las de las adultas.

Las áreas parietales, al igual que las zonas caudales -occipitales y temporales-, no parecen presentar diferencias entre las poblaciones.

El tipo neuronal bipenachado se presenta en las adultas generalmente ocupando las regiones intermedias -exceptuando los polos frontal y occipital- mientras que en las viejas se observan más homogéneamente distribuidas por todas las regiones.

El soma fusiforme típico de este tipo neuronal es más evidente en las áreas temporales (auditivas), sin que por ello dejemos de observar algunas de aspecto más globoso.

Resultados

Las bipolares, las atípicas y las piramidales no presentan diferencias apreciables entre las dos poblaciones.

3.2.4.4.-Capa IV.

El tipo predominante en las adultas es el multipolar mientras que en las viejas existe una proporción similar entre multipolares y bifenachadas.

En relación a las bifenachadas la única diferencia apreciable entre las poblaciones es el número, ya que no se observan cambios en la morfología celular.

El tipo multipolar tampoco presenta otro tipo de diferencia que no sea el de su diferente proporción con relación a las bifenachadas.

Las bipolares mantienen las mismas características en ambas poblaciones. Lo mismo ocurre con las atípicas y las piramidales, que son muy escasas.

3.2.4.5.-Capa V.

No existen diferencias en la proporción de los tipos entre ambas poblaciones, aunque las viejas parece que presentan menor número global de neuronas.

Los tipos neuronales no presentan diferencias evidentes entre las dos poblaciones.

En ambas las zonas profundas de la capa V comienzan a tener características de la capa VI ya comentadas en la población adulta.

Con respecto a los porcentajes relativos por áreas encontramos lo siguiente:

área	tipos neuronales (medias de %)			
	Bipenachada	Bipolar	Multipolar	Atípica
cingular	38	15	28	19
retroesplénica	35	09	17	39
frontal	35	13	30	22
motora	44	10	26	20
somestésica	34	17	23	26
visual	41	16	25	18
auditiva	43	14	23	19
insular dorsal	37	16	27	20

Resultados

3.2.5.-Distribución de las neuronas con sintasa del óxido nítrico en la corteza cerebral.

Comprobamos, tanto en los animales adultos como en los viejos, la existencia de neuronas con la sintasa del óxido nítrico distribuídas a todo lo largo de la corteza cerebral con la excepción de la región del "indusium griseum" (Fig. 184).

En ambos casos la distribución adopta un patrón laminar. El número de neuronas observadas en la capa I es escaso, aunque estas células son aún más infrecuentes en la población de ratas viejas que en la de adultas. En el resto de las capas la proporción de neuronas coincide en ambas (Fig. 184).

Como hecho significativo en las dos poblaciones hemos observado la presencia de territorios donde no aparecen neuronas con la sintasa del óxido nítrico, aunque se puede observar un neuropilo moderadamente marcado con la NADPH-diaforasa (Fig. 189-191).

También se mantuvo, como hecho general, que estos espacios ocuparan todo el espesor de la corteza (se extienden desde la piamadre hasta la sustancia blanca) y que es complicado establecer un patrón comparativo entre amplitud y

localización de los mismos, sin embargo, existen diferencias apreciables entre ambas poblaciones en algunas de las localizaciones en que más se repitieron.

En las dos poblaciones, a medida que nos desplazamos rostro-caudalmente, el número de espacios aumenta y se encuentran más próximos entre sí (Fig. 189-191).

Se comprobó que en ambas era posible observar frecuentemente estos espacios en los límites de las áreas Fr2, Fr1 y Fr3. En los animales viejos vimos, además, que cuando se presentaban en las zonas más caudales de la corteza frontal, las áreas Fr2 y Fr1 estaban ampliamente ocupadas por uno de estos espacios (Fig. 189).

En la corteza parietal se mantiene la misma distribución en ambos grupos y constatamos la existencia de un número considerable de espacios que están más próximos entre sí a medida que nos trasladamos caudalmente (Fig. 189-190).

Existen diferencias a nivel de la corteza occipital: en los animales adultos los espacios están próximos pero el área que ocupan no es amplia, por el contrario, en los viejos, los espacios mantienen una corta distancia entre sí pero su área es más amplia (Fig. 191).

Resultados

La corteza retrosplenial y la porción dorsal de la insular no presentan diferencias apreciables entre las dos poblaciones.

3.2.6.-Relación de las neuronas con la sintasa del óxido nítrico con los vasos sanguíneos.

Las dos poblaciones presentan similares características morfológicas con respecto a las neuronas relacionadas con los vasos sanguíneos (Fig. 211- 213).

La distribución y proporción no presenta diferencias evidentes entre ambas poblaciones.

3.2.7.-Datos obtenidos con la fijación con glutaraldehído.

Se realizó el estudio de la distribución y de la tipología neuronal de las neuronas con la sintasa del óxido nítrico y las comparamos con los resultados que habíamos obtenido para la fijación con paraformaldehído.

Realizados estos estudios no pudimos demostrar diferencias apreciables en lo referente a las neuronas no-piramidales que se presentan en estos animales, de la misma forma que había sucedido en los animales adultos.

Con respecto a las neuronas piramidales observadas, se comprobó la existencia de dos tipos de presentación: el que aparece de forma esporádica tanto en esta población como en la fijada con paraformaldehído, que incluye neuronas de mediano tamaño marcadas en su totalidad que no presentan afinidad por ningún área, zona o capa de la corteza cerebral del animal; y el que muestra neuronas piramidales con marcaje exclusivamente del soma y que encontramos de forma más constante y numerosa.

Estas neuronas no marcadas en su totalidad sólo las observamos en la capa VI_b y de forma aislada, coincidiendo a veces con un aumento del neuropilo. En el resto de las capas no se ha podido comprobar su existencia, lo que impide taxativamente la aparición de una distribución en columnas.

En cambio, en algunas áreas se observa un neuropilo lo suficientemente intenso que remarca los somas de algunas neuronas -áreas próximas o en relación con la cisura rinal-.

Al igual que en los animales adultos, se pudieron apreciar neuronas piramidales con el soma marcado en la zona del claustrum, aunque en menor proporción que en aquellas.

Resultados

Algunos especímenes de esta población presentaban glía positiva con la NADPH-diaforasa.

3.3.- ANIMALES JOVENES (1 mes).

Se realizaron estudios comparativos con los animales adultos, en los que no pudimos demostrar diferencias apreciables en la distribución ni en la tipología de las neuronas no-piramidales, tanto con la fijación con paraformaldehído como con la de glutaraldehído (Fig. 98-106).

Las neuronas piramidales observadas con paraformaldehído también presentaron el mismo tipo de marcaje que en los animales adultos aunque, de igual forma, evidenciamos la presencia de neuronas piramidales marcadas exclusivamente en su soma. El número de neuronas es elevado en las capas donde se presentan y no esporádico como es el caso de las piramidales marcadas en su totalidad.

Estas neuronas piramidales marcadas exclusivamente en el soma se distribuyen preferentemente en las capas II/III y en la capa IV. En la capa V y la VI se presentan en poca cantidad y presentan un mayor tamaño.

En la corteza frontal se observan en algunas áreas como es el caso del área Fr1; además se encuentran con claridad en las áreas motoras de las extremidades y en el área parietal. No se pudieron demostrar en la corteza cingular ni en la retroesplenial.

Estos hallazgos no adoptaron la misma intensidad en todos los animales: en algunos lo observamos de forma clara mientras que, en otros, el marcaje no era del todo nítido.

Este marcaje se hizo más evidente en los animales fijados con glutaraldehído donde se pudo demostrar la existencia de las neuronas piramidales de mediano tamaño marcadas en su totalidad que se presentan de forma esporádica en cualquier área, zona o capa de la corteza cerebral del animal, sin predilección por ninguna en especial; y otro, consistente en la presencia de marcaje exclusivamente en el soma neuronal (Fig.178-180).

Estas neuronas no marcadas en su totalidad se distribuyen preferentemente en columnas, similares en forma a las descritas en los animales adultos (Fig. 180-181).

La amplitud y distribución de las columnas varía en función del área rostro-caudal en la que nos encontremos. Así, en la **corteza cingular**, en el área

Resultados

infralímbica de la corteza frontal medial y en la corteza peduncular dorsal no se pudo evidenciar la existencia de este tipo de marcaje en la corteza.

En cambio, en las **áreas frontales**, se observa de manera evidente la presencia de estas columnas que alcanzan, en general, la capa II. Su límite superior puede considerarse festoneado ya que, a veces, sólo llega a la capa IV. El neuropilo está, a su vez, intensamente marcado mientras bordea o contornea los somas neuronales, haciéndolos aún más evidentes.

La presencia de neuronas en estas columnas varía según las capas, así se puede observar que la capa V evidencia una menor proporción de las mismas aunque, por el contrario, las neuronas presentan un soma de mayor tamaño.

Si analizamos la corteza frontal, y a medida que nos trasladamos caudalmente, observamos como las columnas se prolongan en anchura hacia la corteza motora de las extremidades, ocupando en éstas un menor número de capas: llegan hasta la capa V y a veces a la zona profunda de la capa IV. La capa V, como ya sucedió en las columnas de la corteza frontal, mantiene una menor proporción de neuronas y unos somas de mayor tamaño.

La **corteza parietal** no suele presentar columnas aunque, a veces, sus zonas más rostrales presentan pequeñas columnas que alcanzan la capa V, cuyo límite

superficial parece difuminarse a medida que avanza en la capa V, en la que escasea estas células.

Analizando la **corteza retrosplenial** observamos un comportamiento diferente para la región agranular y para la granular: sólo observamos la presencia de columnas en la región granular. Ocupan la capa VI/V y, a veces, la zona profunda de la capa IV. La capa V sigue manteniendo una menor cantidad de neuronas, aunque presentan un soma de mayor tamaño que en el resto de las capas.

Otras áreas estudiadas fueron las **occipitales**: casi todas ellas presentan columnas; son más importantes y ocupan una mayor cantidad de capas en las áreas occipitales más laterales. En éstas, las columnas alcanzan la capa II y poseen un neuropilo tan intensamente marcado que, en ocasiones, nos permite distinguir la columna sin necesidad de utilizar el microscopio. En las zonas occipitales más ventrales las columnas llegan a las zonas profundas de la capa IV (más bajas).

Donde también observamos alguna columna, no muy amplia, que alcanza la capa V y, rara vez, la zona profunda de la capa IV, es en la corteza temporal y, en algunos casos, en la gustativa.

Resultados

En cuanto a la distribución no relacionada con las columnas hay que comentar una serie de datos:

- 1.- En ningún caso observamos estas neuronas piramidales -no marcadas en su totalidad- ocupando la capa I.
- 2.- La capa II sólo fue ocupada en aquellas áreas en las que se presentó una distribución columnar alta (por lo tanto, en las zonas donde no habían columnas no las pudimos observar).
- 3.- Se observó que en la capa V la proporción era siempre menor a la de otras capas, incluso en las columnas, aunque sus neuronas, en general, poseen un soma de mayor tamaño.
- 4.- En la capa VI superficial estas neuronas piramidales presentan un soma de mediano tamaño, mientras que en la profunda poseen un soma más pequeño.
- 5.- La capa VI profunda mantiene constante este marcaje, exceptuando a la corteza cingular. Además parece existir un aumento del marcaje de la glía en las áreas caudales.
- 6.- La capa VI superficial también mantiene el marcaje aunque no abarca toda su amplitud. Esta circunstancia tampoco se presentó en el área cingular.

No es extraño que en algunas áreas, principalmente la parietal en la que no se forman columnas, podamos observar en la capa IV algunas de estas neuronas. Además se presentan de manera aislada en la capa V, siendo de mayor tamaño.

También es de destacar que, en las zonas cercanas a la cisura rinal, el neuropilo remarca los somas neuronales de la capa II/III, cosa que también sucede en las columnas occipitales más dorsales.

La fijación con glutaraldehído tampoco modificó los datos obtenidos con el paraformaldehído en lo referente a las neuronas relacionada con los vasos sanguíneos (Fig. 214-221).

3.4.-INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los estudios realizados con la inmunohistoquímica demostraron que la distribución y tipología neuronal encontrada con ella era la misma que podíamos ver con la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa, tanto para las neuronas no-piramidales como para las piramidales (Fig. 108-117; 176-177; 182-183; 222-225).

4. Discusión

1.-Sobre la actividad biológica de la NADPH-diaforasa.

Uno de los aspectos más comprometidos que han tenido que afrontar los investigadores que han analizado la presencia de la enzima NADPH-diaforasa ha sido, sin duda alguna, la poca información disponible acerca de la actividad fisiológica de la misma.

En general, las diaforasas pueden definirse como sistemas enzimáticos que pueden oxidar nucleótidos piridínicos reducidos sin necesidad de añadir aceptores (Levine et al., 1.960). De forma más general aún, las diaforasas son consideradas como una clase de deshidrogenasas que catalizan la deshidrogenación de las formas reducidas de los nucleótidos NAD y NADP (Bancroft & Hand, 1.987). De poca significación bioquímica, ya que el término diaforasa no describe una actividad enzimática fisiológica precisa, su empleo en histoquímica ha sido, sin embargo, plenamente aceptado (Vincent & Kimura, 1.992).

La técnica histoquímica para detectar la enzima NADPH-diaforasa en el cerebro se caracteriza por: a) su sorprendente reproductividad; b) la constatación de su presencia en grupos neuronales específicos que no coincidían con la conocida descripción de otras enzimas, neurotransmisores o neuropéptidos (Thomas & Pearse, 1.964; Vincent & Kimura, 1.992); c) el reconocimiento de una enzima

Discusión

particular diferenciada de otras deshidrogenasas que pueden utilizar NADPH (Hope & Vincent, 1.989; Scherer & Singler, 1.983; Thomas & Pearse, 1.964; Vincent et al., 1.983); y, por último; d) su especial comportamiento en situaciones patológicas (Ferrante et al., 1.985; Koh et al., 1.986; Kowall & Beal, 1.988; Thomas & Pearse, 1.961). Todas estas características han contribuido a mantener el interés en la continuidad de los estudios de la NADPH-diaforasa en el cerebro.

Los intentos de caracterización bioquímica (Kuonen et al, 1.988) e histoquímica (Hope & Vincent, 1.989) de la enzima NADPH-diaforasa, permitieron establecer la presencia en el cerebro y en otros tejidos de una enzima directamente relacionada con la enzima detectada en la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa. Sin embargo, poca o ninguna indicación aportaban estos trabajos acerca de la posible actividad fisiológica de la NADPH-diaforasa.

NADPH-diaforasa = Oxido nítrico sintasa

La confirmación de que el radical óxido nítrico (NO) era el responsable de la relajación de las fibras musculares de los vasos sanguíneos (Ignarro et al., 1.987; Palmer et al., 1.987) y la determinación posterior de su presencia en una complejísima variedad de sistemas y tejidos (Moncada et al., 1.991_b) abrieron las puertas de una intensa actividad investigadora.

Una vez que el óxido nítrico fue reconocido como mensajero celular en el sistema nervioso central (Garthwaite et al, 1.988, 1.989) se confirmó la presencia de un enzima formador de óxido nítrico: la óxido nítrico sintasa -NOS- (Knowles et al., 1.989) que fue purificado en breve tiempo (Bredt & Snyder, 1.990), y posteriormente clonada y secuenciada (Bredt et al., 1.991_b), denominándose NOS neuronal, o NOS I.

Los estudios de la actividad catalítica de las óxido nítrico sintasa permitieron conocer que la formación de óxido nítrico se realizaba a partir del aminoácido L-arginina en una reacción que es NADPH dependiente (Knowles et al., 1.989).

La posibilidad de que existiera relación entre la NADPH-d y la NOS fue puesta de manifiesto por primera vez por Hope et al. (1.990) quienes, utilizando un anticuerpo que reconoce la NADPH-d, observaron en western blot que se marcaba una banda correspondiente a una proteína de 150 KD, equivalente a la de la NOS. Trabajos posteriores confirmaron la relación de identidad entre la NADPH-d y la NOS (Dawson et al., 1.991; Hope et al., 1.991). Como consecuencia de ello, se produce una reinterpretación de los datos obtenidos con la técnica histoquímica para detectar la NADPH-d asumiendo que, cuando se usaba la técnica histoquímica, en la realidad, estábamos detectando NOS y, por tanto, células productoras de NO (Vincent & Hope, 1.992; Vincent & Kimura, 1.992). Sin embargo, a pesar de existir una gran mayoría de neuronas en las que se puede considerar una identidad entre

Discusión

NADPH-d y NOS I, algunos autores consideran que los estudios histoquímicos de NADPH-d y los inmunohistoquímicos de NOS presentan ciertas discrepancias en algunas áreas cerebrales (Rodrigo et al, 1.994).

Es esta una compleja controversia de difícil solución, que indudablemente requiere una explicación definitiva de la que aún no disponemos. Desde los primeros trabajos que establecieron la relación entre NADPH-d y NOS se puso de manifiesto que si bien toda la NOS tenía actividad NADPH-d no todas las NADPH-diaforasas poseían actividad NOS (Snyder & Bredt, 1.991).

Estudios bioquímicos posteriores establecen la existencia de múltiples NADPH-d en el cerebro de la rata, de las que la relacionada con la NOS I debe considerarse como una fracción del total de las diaforasas existentes en el cerebro (Matsumoto et al., 1.993; Tracey et al., 1.993). Significativamente la actividad de las NADPH-diaforasas no relacionadas con la NOS I queda abolida por razones desconocidas cuando el tejido es fijado con paraformaldehído 4% (fijador comunmente empleado en el desarrollo de la técnica histoquímica). En ese caso tendremos coincidencia de NADPH-d y NOS en los mismos elementos celulares.

La influencia de la fijación en la reacción histoquímica para determinar NADPH-d no ofrece dudas y varios estudios así lo indican (Buwalda et al., 1.995; Kharazia et al., 1.994; Matsumoto et al., 1.993; Nakos & Gossrau, 1.994). En

áreas cerebrales como el asta de Ammon del hipocampo, cuyas células piramidales no presentan actividad NADPH-d ni tampoco NOS I, se ha descrito la presencia de reacción NADPH-d en dichas células cuando el tejido es tratado con paraformaldehído al 2% o con glutaraldehído. Asimismo, no puede detectarse la NOS I pero sí la NOS III (Dinerman et al., 1.994). En otros casos se ha descrito la presencia de NOS I en las células piramidales del asta de Ammon en tejidos sometidos a un proceso especial de fijación (Wendland et al., 1.994). Además se ha podido observar marcaje de neuronas en varios centros nerviosos tras el daño cerebral en tejido previamente fijado con paraformaldehído al 4%, donde cabe suponer que la única NADPH-diaforasa detectable es la relacionada directamente con las NOS I (Chen & Aston Jones, 1.994; Clowry, 1.993; Divac et al., 1.993; González et al., 1.987; Hong et al., 1.993; Kato et al., 1.994; Kitchener et al., 1.993; Malatino et al., 1.993; Okamura et al., 1.994; Regidor et al., 1.993, 1.994; Ruan et al., 1.994; Solodkin et al., 1.992; Traub et al., 1.994; Vercelli & Cracco, 1.994; Wu, 1.993).

Por otra parte cada vez son más las observaciones que nos muestran la actividad NOS I en el SNC (Endoh et al., 1.994; Fujisawa et al., 1.994; Grossman et al., 1.994; Kadowaki et al., 1.994; Kristensson et al., 1.994; Minc-Golomb et al., 1.994; Squadrito et al., 1.994; Verge et al., 1.992; Villar et al., 1.994; Weiner et al., 1.994; Wu et al., 1.994; Wu & Scott, 1.993; Yu, 1.994; Zhang et al., 1.994).

Discusión

Teniendo en cuenta que, de una manera análoga a lo que ocurre con otros muchos sistemas enzimáticos cerebrales, las NOS se manifiestan durante el desarrollo embrionario y posnatal (Bredt & Snyder, 1.994_a; Croul-Ottman & Brunjes, 1.988; Derer and Derer, 1.993; Ma et al, 1.991; Sajin et al, 1.992; Tomic et al, 1.994; Wetts et al, 1.993; Yan et al, 1.994) en grupos neuronales donde ya no se detectan en el adulto. Durante el desarrollo embrionario del cerebro pueden detectarse variantes de la NOS I (Ogilvie et al., 1.995), y, a su vez, las diferentes formas de NOS pueden ser inducidas en las neuronas por el factor de crecimiento neuronal (NGF) (Peunova & Enikolopov, 1.995): el NO producido en estas células actuaría como una señal citostática necesaria para interrumpir el proceso de división celular y comenzar el proceso de diferenciación.

Si bien es cierta la consideración de que toda la actividad NOS es NADPH-d no es cierto lo contrario (Snyder & Bredt, 1.991) por lo que una parte sustancial de la NADPH-d no está relacionada con la NOS I (Matsumoto et al, 1.993). También hay que tener en cuenta que las investigaciones más recientes ponen de relieve algunos aspectos novedosos acerca de las NOS y en concreto de la NOS neuronal. Efectivamente, hasta el momento la NOS neuronal, o NOS I, se ha considerado como una enzima mayoritariamente citosólica (Förstermann et al., 1.991, 1994; Griffith & Stuehr, 1.995; Matsumoto et al., 1.993; Nathan & Xie, 1.994; Sessa, 1.994; Stuehr & Griffith, 1.992), sin embargo, nuevas observaciones indican que una parte sustancial de la NOS I está unida a membrana (Hecker et al., 1.994), lo

que coincide con las observaciones ultraestructurales, en las que gran parte del marcaje se localiza a nivel de membranas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Faber-Zuschratter & Wolf, 1.994; Mitzukawa et al., 1.988_a; Wolf et al., 1.992).

Por último los estudios de las NOS en el cerebro mediante la determinación radioautográfica del inhibidor específico, [H^3] L-n-g-nitroarginina, presentan datos totalmente equiparables a los obtenidos con la NADPH-d (Burazin & Gundlach, 1.995; Kidd et al., 1.995).

Para terminar este apartado, no podemos dejar de analizar la relación existente entre las NOS y la reductasa del citocromo P450, las cuales presentan una importante homología estructural y funcional (Bredt et al., 1.991_b; Porter & Kasper, 1.985), así como la posibilidad de que parte de la actividad NADPH-d cerebral pueda ser asignada a la citocromo P450 reductasa (CPR) y no a las isoformas de NOS.

Si bien los primeros estudios de la localización de la CPR en el cerebro indicaban su presencia en grupos neuronales diferentes a los que poseían NADPH-d (Haglund et al., 1.984; Vincent, 1.986), estudios más recientes detallan la coincidencia de algunas localizaciones de la CPR y la NOS, fundamentalmente en neuronas corticales no piramidales de la capa II a V, pero no en la capa VI (Norris

Discusión

et al., 1.994). Ese mismo estudio establece la presencia de CPR en neuronas piramidales de la corteza cerebral en una localización en la que se ha descrito inducción de NADPH-d (Regidor et al., 1.993_b). La relación de la CPR con las neuronas que contienen diversas isoformas de CPR y observaciones de que la CPR es inducible selectivamente (Ravindranath et al., 1990), dejan abierta la posibilidad de que, en determinadas circunstancias, pueda ser detectada NADPH-d en relación con CPR en neuronas piramidales.

2.-NOS/NADPH-d presente en las neuronas de la corteza cerebral.

Desde las primeras referencias a neuronas ricas en NADPH-d (Thomas y Pearse, 1961) quedó establecido que, en la corteza cerebral, las neuronas ricas en NADPH-d constituían un grupo cuantitativamente pequeño, aunque particularmente sorprendente por su especial actividad enzimática. Los estudios bioquímicos de la actividad de la NOS/NADPH-d en el cerebro coinciden en determinar que la corteza cerebral es un lugar de baja actividad en comparación con otras áreas cerebrales. En general puede decirse que sólo del 1 al 2% del total de las neuronas corticales presentan NOS/NADPH-d (Lowestein & Snyder, 1992).

En general, se acepta que las neuronas NOS/NADPH-d de la corteza pertenecen al grupo de las no-piramidales (Thomas & Pearse, 1961; Snyder & Brecht, 1991; Vincent & Hope, 1992).

De los estudios realizados hasta la fecha -probablemente debido al bajo número de neuronas de la corteza- poca atención se ha prestado al análisis detallado de su morfología, distribución y localización. Tal vez el trabajo que aporta una descripción más completa de los tipos neuronales NOS/NADPH-d en la corteza cerebral de la rata sea el de Leigh et al. (1.990), quienes describen tres tipos celulares: multipolares, bipolares en capas II a V y grandes multipolares y bipolares de las capas VI y de la sustancia blanca cortical. Meyer et al. (1.991) hacen un estudio detallado de las neuronas de la sustancia blanca coincidiendo con la descripción de Leigh en la población mixta bipolares y multipolares que ellos consideran como neuronas de la capa VI_b, desplazadas cuyos axones se extienden en el espesor de la corteza. Este dato coincide con los estudios de Divac et al. (1.987) en los que se demuestra que la mayor parte de las neuronas de la capa VI_b de la corteza cerebral de la rata presentan axones ascendentes en la corteza. Vincent y Kimura (1.992) en su extenso trabajo sobre la distribución de las neuronas NOS/NADPH-d en el cerebro de la rata prestan muy poca atención a la corteza cerebral indicando solamente que en ella se encuentran células multipolares grandes. Sorprendentemente, estos autores equiparan dichas células a las células NOS/NADPH-d del núcleo olfatorio anterior.

Druga & Syka (1.993) analizan el área auditiva de la rata haciendo un análisis de la distribución de las neuronas NOS/NADPH-d en las diferentes capas corticales. Indican que no hay neuronas NOS/NADPH-d en capa I y que la mayor densidad se

Discusión

encuentra en las capas más profundas. En lo que hace referencia a tipos neuronales señalan que las neuronas multipolares son más frecuentes que las bipolares y que las bipenachadas y que, además, la mayor variedad de formas se encuentran en la capa VI. Contrariamente a esa observación Valstschanoff et al. (1.993_b) refieren que las neuronas NOS/NADPH-d están distribuidas uniformemente en todas las áreas corticales y que la mayor densidad celular se localiza en las capas II-III. Consideran que el tipo neuronal más frecuente es el de las bipolares no espinosas y que en las capas más profundas predominan las multipolares; asimismo detectan algunas neuronas de tipo piramidal.

Por último Rodrigo et al (1.994), en su extenso análisis del cerebro de rata empleando técnicas inmunohistoquímicas, prestan poca atención a la corteza cerebral. Describen las neuronas NOS como no espinosas de morfología fusiforme, triangular y multipolar. No hacen mención a las neuronas de la sustancia blanca ni a la distribución general en las capas y/o áreas corticales.

Las observaciones realizadas en la corteza cerebral del gato (Kuchiiwa et al., 1.994; Mizukawa et al., 1.988_b; Mizukawa et al., 1.989), coinciden con las dadas para la rata en términos generales, en cuanto a tipos neuronales se refiere. Se observa una distribución generalizada en todas las áreas corticales sin predominio por alguna en particular, con presencia de neuronas mayoritariamente multipolares pero con una clara abundancia en las capas profundas de la corteza.

En la corteza cerebral del mono los datos son análogos a los descritos para el gato: abundancia de células NOS/NADPH-d en capas profundas y sustancia blanca, cuya morfología es multipolar, bipolar o bipenachada (Hashikawa et al., 1.994; Sandell, 1.986). En las capas superficiales se aprecia mayor abundancia de neuronas debilmente marcadas con la enzima y en las que dificilmente se consigue detectar su árbol dendrítico, siendo ésta una característica no detectada en gato o en rata. Es interesante destacar la apreciación de Sandell (1.986) del marcaje de algunas células piramidales gigantes de la capa V de la corteza visual del mono.

En el cerebro humano los estudios de la corteza cerebral permiten detectar una distribución de las neuronas NOS/NADPH-d muy similar a la descrita para mono (Aoki et al., 1.993; Kowall & Beal, 1.988; Unger & Lange, 1.992). Siendo el trabajo de Fischer & Kuljis (1.994) el más detallado en cuanto a morfología neuronal.

La descripción de tipos neuronales NOS/NADPH-d en la corteza cerebral de la rata así como en la de otros mamíferos, destaca por la pobreza de sus detalles y por la heterogeneidad de la nomenclatura. Este hecho es llamativo teniendo en cuenta que la mayoría de los autores que estudian la morfología de las neuronas corticales han aceptado unos criterios que los estudiosos de las neuronas NOS/NADPH-d parecen no haber seguido (Fairén et al., 1.984; Feldman & Peters, 1.978; Jones, 1.975; Peters & Regidor, 1.981; White, 1.989).

Discusión

En cualquier caso, nuestros datos sugieren la existencia de una población neuronal NOS/NADPH-d en la corteza cerebral de la rata que destaca por la variedad de tipos neuronales y por su desigual distribución en capas y en áreas corticales.

Tal vez el estudio más detallado de la morfología de las neuronas no-piramidales de la corteza cerebral de la rata se deba a Feldman y Peters (1.978) en su estudio mediante el método de Golgi de las neuronas no-piramidales de la corteza visual de la rata. Los tipos neuronales ricos en NOS/NADPH-d que hemos encontrado en nuestro estudio así como su distribución en las capas corticales están perfectamente descritos por los autores citados, a excepción del grupo que hemos denominado células atípicas.

De acuerdo con su morfología, no-piramidal, la mayoría de las neuronas NOS/NADPH-d deben ser GABAérgicas (Esclaplez et al., 1.987; Fairén et al. 1.984; Meinecke & Peters, 1.987; Somogyi et al., 1.984), como así ha sido confirmado en rata (Hedlich et al., 1.990; Valtschanoff et al., 1.993_b) y en la corteza temporal humana (Unger & Lange, 1.992).

La mayoría de las neuronas NOS/NADPH-d contiene los neuropéptidos somatostatina y neuropéptido Y (Fischer & Kuljis, 1.994; Kowall & Beal, 1.988; Vincent et al., 1.983_a). Es importante destacar la descripción de neuronas de

morfología "atípica" en los estudios de Lin et al. (1.986) de las neuronas somatostatinérgicas. Unger & Lange (1.992) detectan diferencias entre las neuronas NOS/NADPH-d de las capas superficiales de la corteza temporal humana, que no poseen somatostatina, frente a las neuronas de las capas profundas, que sí la poseen, hallazgo que no se ha detectado en otros mamíferos.

En todo caso, debemos recordar el complejo sistema de colocación de neuropéptidos en las células GABAérgicas (De Felipe, 1.993_b). Así, podemos decir que la práctica totalidad de las neuronas con somatostatina son GABAérgicas y que además contienen Neuropéptido Y. La coexistencia en células GABA de colecistocinina (CCK) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) se observa en menor medida. Es interesante señalar que el VIP puede coexistir tanto en células GABAérgicas como colinérgicas (Papadopoulos et al., 1.987). Aunque se ha descrito que en un 50% de las interneuronas colinérgicas de la corteza cerebral de la rata coexisten con el neurotransmisor GABA en neuronas bipolares de capas superficiales (Kosaka & Heizmann, 1.989), no se ha podido comprobar la coexistencia en dichas células de la enzima NOS/NADPH-d.

El péptido intestinal vasoactivo no ha sido localizado en las neuronas NOS/NADPH-d (Beal et al., 1.991) y no hay citas acerca de la localización del péptido colecistocinina, a pesar de localizarse abundantemente en la corteza cerebral en neuronas multipolares y bipolares (Emson & Marley, 1.983).

Discusión

Por último las neuronas NOS/NADPH-d se caracterizan por carecer o presentar bajos niveles de las proteínas tamponadoras de calcio: parvalbumina, calbindina y calretinina (Dun et al., 1994; Hedlich et al., 1990) que, sin embargo, se consideran presentes en la mayor parte de las neuronas GABAérgicas (Bainbridge et al., 1.992; Celio, 1986).

En consecuencia, las neuronas NOS/NADPH-d de la corteza cerebral parecen formar un subgrupo particular de neuronas GABAérgicas conteniendo, la mayor parte de ellas, los neuropéptidos somatostatina y Neuropéptido Y y careciendo de proteínas tamponadoras de calcio.

Neuronas piramidales

De forma esporádica, y en cantidad prácticamente inapreciable, se localizan con la técnica histoquímica NADPH-d neuronas cuya morfología recuerda a la de las células piramidales. Esta observación coincide con las de Sandell (1986) en corteza visual de mono, y con Valtschanoff et al (1993_b), en corteza somatosensitiva de rata.

En situaciones experimentales y/o patológicas, en la corteza cerebral de la rata se han descrito neuronas piramidales ricas en NADPH-d. En las áreas inmediatas a las zonas de daño tisular (Kitchener et al., 1.993; Regidor et al.,

1993_b) o en experimentos "in vitro" (Divac et al., 1.993). En animales postnatales es fácil observar la presencia de gran número de neuronas piramidales ricas en NADPH-d. De confirmarse la existencia de NOS en esas neuronas podemos interpretar su existencia en la corteza cerebral adulta como un remanente de las neuronas piramidales que la poseían durante el desarrollo postnatal.

3.-El neuropilo

Si la densidad de neuronas ricas en NOS/NADPH-d es baja en la corteza cerebral de la rata, no ocurre lo mismo con el profuso plexo de fibras que la pueblan. Este rico neuropilo presenta una clara organización, atendiendo a su densidad relativa en las diferentes capas, que nos ha permitido establecer diferencias entre las distintas áreas corticales. Este hecho ha sido prácticamente desatendido en la bibliografía consultada. Solamente hemos encontrado algunas referencias a la menor densidad de neuropilo en la capa I (Vincent y Kimura, 1992) o a la mayor intensidad de marcaje en las capas IV y VI (Hashikawa et al., 1994; Sandell, 1986) o las diferencias entre áreas (Fischer & Kuljis, 1994). En otros casos, sin embargo, no detectan esas diferencias (Rodrigo et al. 1994).

La desigual distribución de fibras NOS/NADPH-d en las capas corticales y en las diferentes áreas de la corteza nos ofrece una imagen que coincide con la encontrada para la enzima citocromo oxidasa (Franca & Volchan, 1995; Hashikawa

Discusión

et al., 1994; Regidor & Poch, 1987; Sandell, 1986): este hecho es significativo si se confirma que el NO ejerce una acción inhibitoria reversible sobre la citocromo oxidasa (Cleeter et al., 1994) así como sobre los citocromos P450 (Stadler et al., 1994; Wink et al., 1993).

Origen de las fibras del neuropilo NOS/NADPH-d.

La corteza cerebral recibe aferencias procedentes de múltiples núcleos subcorticales, así como de otras áreas corticales ipsi y contralaterales (ver revisión en Divac et al., 1995).

Aunque algunos autores han expresado la opinión de que las fibras NOS/NADPH-d observadas en la corteza son de origen estrictamente local (Hashikawa et al., 1994; Kuchiiwa et al., 1994), poca atención se ha prestado al estudio del posible origen subcortical del rico neuropilo NOS/NADPH-d cortical. No obstante, es interesante destacar que, de los múltiples núcleos subcorticales que proyectan a la corteza cerebral (los núcleos colinérgicos basales y la sustancia innominada), no son precisamente las neuronas NOS/NADPH-d que en ellos se encuentran las que proyectan de la corteza. Este hallazgo coincide con los datos de Freund y Gulyas (1991) para los que la mayoría de las aferencias a las neuronas GABAérgicas de la corteza procedentes de los núcleos basales telencefálicos, son también GABAérgicas.

Siguiendo la descripción de Divac et al. (1.995) de las fuentes de las aferencias a la corteza cerebral podemos decir que, en buena medida, desconocemos el posible origen de las fibras NOS/NADPH-d procedentes de esos núcleos. Si destacamos los núcleos magnocelulares del telencéfalo basal y los núcleos talámicos, otras áreas como el claustrum, la amígdala, la zona inserta, las regiones dorsomediales y caudolaterales del hipotálamo, el área tegmental ventral, el núcleo tegmental dorsal, los núcleos mediano y dorsal del raphe, el núcleo parabraquial mesencefálico y el locus coeruleus deben ser investigados más detalladamente para definir su relación con el entramado de fibras nitrérgicas de la corteza cerebral.

Por último considerando que las neuronas no piramidales no envían axones a la corteza contralateral, hemos de asumir que el origen de ese rico neuropilo debe entenderse de origen local, y que es debido en gran parte a las arborizaciones axónicas de las propias neuronas NOS/NADPH-d.

Sea cual sea definitivamente el origen del extenso neuropilo nitrérgico cortical, es significativo destacar que es en él donde más alteraciones se han detectado tanto en situaciones experimentales de privación sensorial (Aoki et al., 1.993) como en situaciones patológicas (Kowall & Beal, 1.988).

4.-Efecto del envejecimiento.

Coincidiendo con los estudios bioquímicos realizados al efecto (Mollace et al., 1.995) la corteza cerebral no experimenta alteraciones significativas en cuanto a la actividad de la NOS. En nuestros animales no hemos detectado diferencias significativas en cuanto a los tipos neuronales NOS/NADPH-d ni en su distribución en las áreas corticales, entre las ratas viejas y adultas. Estos datos coinciden también con los descritos para el estriado y para el núcleo latero-dorsal del tegmento, que tampoco presenta variaciones significativas con la edad (Kawamata et al., 1989). Únicamente pequeñas diferencias en la densidad del neuropilo en las áreas occipitales merecen comentario.

5.-Sobre el control del flujo sanguíneo cerebral local.

El sistema nervioso central depende casi enteramente de la glucosa para su metabolismo energético. Existe, por tanto, una íntima relación entre el metabolismo energético y la actividad funcional cerebral (Sokoloff, 1.977). La glucosa, como otras muchas sustancias, alcanzan el territorio cerebral siguiendo la ruta del sistema vascular, por lo que pocas dudas existen de la presencia de una estrecha relación entre el metabolismo y el flujo sanguíneo cerebral (Edvinsson et al., 1.993), estando bien establecida la relación entre el incremento del flujo sanguíneo en un área cerebral como respuesta a un incremento de la actividad neuronal en la misma.

En ese sentido, Silver (1.978) demostró que el flujo sanguíneo local se incrementa un segundo después de iniciarse la actividad neuronal.

En el cerebro existen varios neurotransmisores y neuropéptidos vasoactivos capaces de ajustar el tono de los vasos, cambiando así el flujo sanguíneo (ver revisión en Edvinsson et al., 1.993). Por otra parte, no podemos olvidar la propia actividad del endotelio en esa función (ver revisión en Inagami et al., 1.995). Entre todos estos factores, el óxido nítrico participa tanto en el control del flujo sanguíneo corporal general como en el cerebral (ver revisión en Umans & Levi, 1.995).

A pesar de que se ha constatado que el óxido nítrico participa en la regulación de la circulación cerebral (Iadecola et al., 1.994; Toda & Okamura, 1.991) el mecanismo íntimo de acoplamiento entre la actividad nerviosa y el flujo sanguíneo sigue aún sin explicación (Lou et al., 1.987).

De entre las diversas posibilidades de acción del NO como principal agente vasodilatador en el flujo sanguíneo cerebral local, la que podemos considerar como poco probable (debido fundamentalmente a su inespecificidad) es la de que sea el endotelio de los propios vasos el centro productor del NO en respuesta a estímulos que viajen en la sangre. Otra posibilidad sería la de que axones procedentes de otras áreas corticales y subcorticales estimulen mediante la liberación de sus

Discusión

neurotransmisores y neuropéptidos la producción de NO por las células endoteliales de los vasos corticales. en muchos casos, las paredes vasculares están inervadas por fibras nitrérgicas, las cuales liberarían directamente el NO, como ha sido puesto de manifiesto reiteradamente (De Felipe, 1.993_a; Iadecola et al., 1.993; Poeggel et al., 1.992). Este hecho, constatado también en nuestro material supone una posible explicación al acoplamiento entre el flujo sanguíneo cerebral local y la actividad nerviosa observada en la rata (Dirnagl et al., 1.993). Por último, la descripción por Regidor et al. (1.993_a) de neuronas nitrérgicas directa e íntimamente relacionadas con ciertos vasos corticales de la rata, hallazgo confirmado más tarde por Estrada et al. (1.993) en la corteza cerebral del gato y por Zhang et al. (1.995) en la corteza cerebral del hombre, y demostrada exhaustivamente en nuestro material, abre la posibilidad de un control de primera magnitud sobre ciertos vasos cerebrales. Esto es así si consideramos que la cantidad de NO producida por el soma y las dendritas de una célula nitrérgica adosada a un vaso es, lógicamente, muy superior al que puede ser liberado por una serie discreta de botones sinápticos. Además, la masiva producción de óxido nítrico tendría la particularidad de ejercer una acción que afectaría al volumen de tejido nervioso que ocupa una esfera de aproximadamente 0,3 mm de diámetro (Garthwaite & Boulton, 1.995), lo que implicaría el fino acoplamiento de la actividad nerviosa local y del flujo sanguíneo del área.

En nuestra opinión la baja densidad de neuronas corticales NOS/NADPH-d no es motivo para despreciar su análisis pormenorizado, antes al contrario, creemos que su presencia en la corteza cerebral es un aspecto más de su organización y, por ello, su estudio debe ser lo más detallado posible si queremos desentrañar el papel que esas neuronas juegan en la organización funcional de la corteza cerebral.

5. Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- Se realiza por primera vez un análisis pormenorizado y sistemático de las neuronas productoras del radical óxido nítrico y del plexo axonal (neuropilo) correspondiente en la corteza cerebral de la rata juvenil, adulta y vieja.

2.- Las neuronas productoras del radical NO en la corteza cerebral de la rata son no-piramidales, en su mayor parte, cuya morfología, densidad y distribución no se altera con la edad.

3.- En las ratas adultas existe un predominio de las neuronas bipenachadas y multipolares frente a las bipolares y atípicas, siendo más acusada esta tendencia en las regiones visual y auditiva.

4.- En las ratas adultas se pueden detectar esporádicamente neuronas de morfología piramidal. Sin embargo, en ratas jóvenes se puede apreciar una alta densidad de neuronas piramidales en las que solo se detecta la enzima en el pericarion. La presencia de la enzima en esas neuronas desaparece progresivamente durante el crecimiento.

Conclusiones

- 5.- La corteza cerebral presenta un profuso neuropilo rico en la enzima NOS/NADPH-d de origen mayoritariamente intracortical, aunque no podemos descartar la existencia de fibras nitrérgicas subcorticales.

- 6.- El neuropilo nitrérgico presenta una distribución desigual en los estratos corticales, siendo las capas I y V donde presenta una menor densidad.

- 7.- Cada área cortical presenta un patrón característico de distribución de las fibras nitrérgicas.

- 8.- Hay una disminución con la edad de la densidad del neuropilo nitrérgico en las regiones occipitales.

- 9.- Todos los vasos sanguíneos corticales reciben una importante inervación nitrérgica.

- 10.- La presencia de neuronas nitrérgicas íntimamente adosadas a ciertos vasos corticales confirma la hipótesis del papel de esas neuronas en el control neural del flujo sanguíneo cerebral local.

6. Bibliografía

- Abu-Soud, H.M. & Stuehr, D.J. (1993). Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, *90*, 10769-10772.
- Alonso, J.R., Arévalo, R., Porteros, A., Briñon, J.G., Lara, J., & Aijón, J. (1993). Calbindin-D-28K and NADPH-Diaphorase Activity Are Localized in Different Populations of Periglomerular Cells in the Rat Olfactory Bulb. *J Chem Neuroanat*, *6*, 1-6.
- Aoki, C., Fenstermaker, S., Lubin, M., & Go, C.G. (1993). Nitric Oxide Synthase in the Visual Cortex of Monocular Monkeys as Revealed by Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry. *Brain Res*, *620*, 97-113.
- Baek, K.J., Thiel, B.A., Lucas, S. & Stuehr, D.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem*, *268*, 21120-21129.
- Baimbridge, K.G., Celio, M.R. & Rogers, J.H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*, *15*, 303-308.
- Bancroft, J.D., & Hand, N.M. (1987). Enzyme histochemistry. *Royal Microscopical Society. Oxford University Press*.
- Beal, M.F., Swartz, K.J., Finn, S.F., Mazurek, M.F., & Kowall, N.W. (1991). Neurochemical Characterization of Excitotoxin Lesions in the Cerebral Cortex. *J Neurosci*, *11*, 147-158.
- Beckman, J.S. (1991). The Double-Edged Role of Nitric Oxide in Brain Function and Superoxide-Mediated Injury. *J Dev Physiol*, *15*, 53-59.
- Bohme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A. & Blanchard, J.C. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, *199*, 379-381.
- Bredt, D.S., Ferris, C.D. & Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. *J Biol Chem*, *267*, 10976-10981.
- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M., & Snyder, S.H. (1991). Nitric Oxide Synthase Protein and Messenger RNA Are Discretely Localized in Neuronal Populations of the Mammalian CNS Together with NADPH-Diaphorase. *Neuron*, *7*, 615-624.

Bibliografia

- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, T.T. & Snyder, S.H. (1991_b). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase. *Nature*, **351**, 714-718.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 682-685.
- Bredt, D.S., & Snyder, S.H. (1994_a). Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*, **13**, 301-313.
- Bredt, D.S., & Snyder, S.H. (1994_b). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, **63**, 175-195.
- Burazin, T.C.D. & Gundlach, A.L. (1995). Localization of NO synthase in rat brain by [H-3]L-N-G-nitro-arginine autoradiography. *Neuroreport*, **6**, 1842-1844.
- Busconi, L., & Michel, T. (1993). Endothelial nitric oxide syntase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem*, **268**, 8410-8413.
- Butler, A.R., Flitney, F.W. & Williams, D.L.H. (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 18-22.
- Buwalda, B., Nyakas, C., Gast, J., Luiten, P.G.M. & Schmidt, H.H.H.W. (1995). Aldehyde fixation differentially affects distribution of diaphorase activity but not of nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain. *Brain Res Bull*, **38**, 467-473.
- Celio, M.R. (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*, **231**, 995-997.
- Chen, S., & Aston Jones, G. (1994). Cerebellar injury induces NADPH diaphorase in Purkinje and inferior olivary neurons in the rat. *Exp Neurol*, **126**, 270-276.
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D. & Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*, **176**, 599-604.
- Cleeter, M.W.J., Cooper, J.M., Darleyusmar, V.M., Moncada, S., & Schapira, A.H.V. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide -Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, **345**, 50-54.

-
- Clowry, G.J. (1993). Axotomy Induces NADPH Diaphorase Activity in Neonatal But Not Adult Motoneurons. *Neuroreport*, *5*, 361-364.
- Croul-Ottman, C.E., & Brunjes, P.C. (1988). NADPH diaphorase staining within the developing olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Brain Res*, *460*, 323-328.
- Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M., & Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*, 7797-7801.
- De Felipe, J. (1993_a). A Study of NADPH Diaphorase-Positive Axonal Plexuses in the Human Temporal Cortex. *Brain Res*, *615*, 342-346.
- De Felipe, J. (1993_b). Neocortical Neuronal Diversity - Chemical Heterogeneity Revealed by Colocalization Studies of Classic Neurotransmitters, Neuropeptides, Calcium-Binding Proteins, and Cell Surface Molecules. *Cereb Cortex*, *3*, 273-289.
- Derer, P., & Derer, M. (1993). Ontogenesis of NADPH-Diaphorase Neurons in the Mouse Forebrain. *Neurosci Lett*, *152*, 21-24.
- Deutsch, S.I., & Morihisa, J.M. (1988). Glutamatergic abnormalities in Alzheimer's disease and a rationale for clinical trials with L-glutamate. *Ch Pharmacol*, *11*, 18-35.
- Dinerman, J.L., Dawson, T.M., Schell, M.J., Snowman, A., & Snyder, S.H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 4214-4218.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., & Villringer, A. (1993). Role of Nitric Oxide in the Coupling of Cerebral Blood Flow to Neuronal Activation in Rats. *Neurosci Lett*, *149*, 43-46.
- Divac, I., Marinkovic, S., Mogensen, J., Schwerdtfeger, W. & Regidor, J. (1987). Vertical ascending connections in the isocortex. *Anat Embryol*, *175*, 443 - 455.
- Divac, I., Ramírez González, J.A., Ronn, L.C.B., Jahnsen, H., & Regidor, J. (1993). NADPH-Diaphorase (Nos) Is Induced in Pyramidal Neurons of Hippocampal Slices. *Neuroreport*, *5*, 325-328.

Bibliografía

- Divac, I., Regidor, J., Milosevic, S., Mogensen, J. & Zilles, K. (1995). Afferents to different layers of the dorsolateral isocortex in rats. *Anat Embryol*, *192*, 63-75.
- Druga, R., & Syka, J. (1993). NADPH-Diaphorase Activity in the Central Auditory Structures of the Rat. *Neuroreport*, *4*, 999-1002.
- Duckett, S. & Pearse, A.G.E. (1964). The nature of the solitary active cells of the central nervous system. *Experientia*, *20*, 259-260.
- Dun, N.J., Dun, S.L., Forstermann, U., & Tseng, L.F. (1992). Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in Rat Spinal Cord. *Neurosci Lett*, *147*, 217-220.
- Dun, N.J., Huang, R., Dun, S.L., & Forstermann, U. (1994). Infrequent co-localization of nitric oxide synthase and calcium binding proteins immunoreactivity in rat neocortical neurons. *Brain Res*, *666*, 289-294.
- Edvinsson, L., MacKenzie, E.T. & McCulloch, J.J. (1993). Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Raven Press. New York*.
- Egberongbe, Y.I., Gentleman, S.M., Falkai, P., Bogerts, B., Polak, J.M., & Roberts, G.W. (1994). The Distribution of Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in the Human Brain. *Neuroscience*, *59*, 561-578.
- Emson, P.C. & Marley, P.D. (1983). Cholecystikinin and vasoactive intestinal polypeptide. En: *Handbook of Psychopharmacology*, *16*, pp. 255-306. Iversen, L., Iversen, S.D. & Snyder, S.H. (Eds.). *Plenum Pub. Co., New York*.
- Endoh, M., Maiese, K., & Wagner, J.A. (1994). Expression of the neural of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. *Neuroscience*, *63*, 679-689.
- Esclapez, M., Campistron, G. & Trottier, S. (1987). Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat. *Neurosci Lett*, *77*, 131-136.
- Estrada, C., Mengual, E., & Gonzalez, C. (1993). Local NADPH-Diaphorase Neurons Innervate Pial Arteries and Lie Close or Project to Intracerebral Blood Vessels - A Possible Role for Nitric Oxide in the Regulation of Cerebral Blood Flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, *13*, 978-984.
- Faber-Zuschratter, H., & Wolf, G. (1994). Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in cortical synapses. *Neuroreport*, *5*, 2029-2032.

- Fairén, A., De Felipe, J. & Regidor, J. (1984). The non-pyramidal neurons: General account. En: *"The Cerebral Cortex"*. Vol. 1. 201-253. A. Peters & E.G. Jones.(Eds). *Plenum Press, New York*.
- Feldman, M.L. & Peters, A. (1978). The forms of the non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. *J comp Neurol*, *179*, 761-794.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Richardson, E.P., Bird, E.D., & Martin, J.B. (1985). Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science*, *230*, 561-563.
- Fischer, H.C., & Kuljis, R.O. (1994). Multiple types of nitrogen monoxide synthase-NADPH diaphorase-containing neurons in the human cerebral neocortex. *Brain Res*, *654*, 105-117.
- Förstermann, U. Closs, E.I, Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, *23*, 1121-1131.
- Förstermann, U., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M., & Murad, F. (1991). Isoforms of Nitric Oxide Synthase - Characterization and Purification from Different Cell Types. *Biochem Pharmacol*, *42*, 1849-1857.
- Franca, J.G., & Volchan E. (1995). NADPH-diaphorase histochemistry as a marker for barrels in rat somatosensory cortex. *Brazilian J Med Res*, *28*, 787-790.
- Freund, T.F., & Gulyas, A.I. (1991). GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in rat neocortex. *J comp Neurol*, *314*, 187-199.
- Fujisawa, H., Ogura, T., Kurashima, Y., Yokoyama, T., Yamashita, J., & Esumi, H. (1994). Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem*, *63*, 140-145.
- Furchgott, R.F., & Zawadski, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, *288*, 373-376.
- Gally, J.A., Montague, P.R., Reeke, G.N., & Edelman, G.M. (1990). The No hypothesis: Possible effects of short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, *87*, 3547-3551.

Bibliografia

- Garthwaite, J., & Boulton, C.L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, *57*, 683-706.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, *336*, 385-388.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., & Moncada, S. (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol*, *172*, 413-416.
- Garthwaite, J., Southam, E., & East, S. J. (1991). Excitatory Amino Acids and Nitric Oxide Formation. *Excitatory Amino Acids*, *5*, 249-254.
- Geula, C., Schatz, C.R., & Mesulam, M.M. (1993). Differential Localization of NADPH-Diaphorase and Calbindin-D(28k) Within the Cholinergic Neurons of the Basal Forebrain, Striatum and Brainstem in the Rat, Monkey, Baboon and Human. *Neuroscience*, *54*, 461-476.
- González, M.F., Sharp, F.R., & Sagar, S.M. (1987). Axotomy increases NADPH-diaphorase staining in rat vagal motor neurons. *Brain Res Bull*, *18*, 417-427.
- Greenamyre, J.T., Maragos, W.F., Albin, R.L., Penney, J.B., & Young, A.B. (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat*, *12*, 421-430.
- Griffith, O.W. & Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, *57*, 707-736.
- Gross, S.S. & Wolin, M.S. (1995). Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*, *57*: 737-769.
- Grossman, A.B., Rossmann, W.G., Kabigting, E.B., Cadd, G., Clifton, D., & Steiner, R.A. (1994). The Distribution of Hypothalamic Nitric Oxide Synthase Messenger RNA in Relation to Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurons. *J Endocrinol*, *140*, R5-R8.
- Haglund, L., Kohler, C., Haaparnata, T., Goldstein, M., & Gustafsson, J.A. (1984). Presence of NADPH-cytochrome P450 reductase in central catecholaminergic neurones. *Nature*, *307*, 259-262.
- Hashikawa, T., Leggio, M.G., Hattori, R., & Yui, Y. (1994). Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity Colocalized with NADPH-Diaphorase Histochemistry in Monkey Cerebral Cortex. *Brain Res*, *641*, 341-349.

- Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior. *Wiley, New York*.
- Hecker, M., Mulsch, A., & Busse, R. (1994). Localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem*, *62*, 1524-1529.
- Hedlich, A., Luth, H.J., Werner, L., Bar, B., Hanish, U., & Winkelmann, E. (1990). GABAergic NADPH-diaphorase-positive Martnottizellen im visuellem cortex der ratte. *J Hirnforsch*, *31*, 681-687.
- Holmqvist, B.I., Ostholm, T., Alm, P., & Ekstrom, P. (1994). Nitric Oxide Synthase in the Brain of a Teleost. *Neurosci Lett*, *171*, 205-208.
- Hong, S.C., Lanzino, G., Collins, J., Kassell, N.F., & Lee, K.S. (1993). Selective loss of NADPH-diaphorase-containing neurons in the dentate gyrus following transient ischemia. *Neuroreport*, *5*, 84-86.
- Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., & Vincent, S.R. (1991). Neuronal NADPH Diaphorase Is a Nitric Oxide Synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*, 2811-2814.
- Hope, B.T., Michaels, g., Knigge, K.M., & Vincent, S.R. (1990). NADPH-Diaphorase synthesizes a second messenger; yes or not. *Soc Neurosci Abstr*, *16*, 538
- Hope, B.T. & Vincent, S.R. (1989). Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J Histochem Cytochem*, *37*, 653-661.
- Iadecola, C., Beitz, A.J., Renno, W., Xu, X., Mayer, B., & Zhang, F. (1993). Nitric Oxide Synthase-Containing Neural Processes on Large Cerebral Arteries and Cerebral Microvessels. *Brain Res*, *606*, 148-155.
- Iadecola, C., Pelligrino, D.A., Moskowitz M.A., & Lassen N.A. (1994). Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cerebral Blood Flow Metab*, *14*, 175-192.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrives, R.E. & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produce and released from artery and veins is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, *84*, 9265-9269.
- Inagami, T., Nasure, M. & Hoover, R. (1995). Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol*, *57*, 171-189.

Bibliografía

- Janssens, S.P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D.B. & Bloch, K.D. (1992). Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, *267*, 14519-14522.
- Jones, E.G. (1975). Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J comp Neurol*, *160*, 205-268.
- Kadowaki, K., Kishimoto, J., Leng, G., & Emson, P.C. (1994). Up-Regulation of Nitric Oxide Synthase (Nos) Gene Expression Together with Nos Activity in the Rat Hypothalamo-Hypophysial System After Chronic Salt Loading. - Evidence of a Neuromodulatory Role of Nitric Oxide in Arginine Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Endocrinology*, *134*, 1011-1017.
- Kato, H., Kogure, K., Liu, Y., Araki, T., & Itoyama, Y. (1994). Induction of NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in a rat model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Brain Res*, *652*, 71-75.
- Kawamata, T., Nakamura, S., Akiguchi, I., Kimura, J., Kameyama, M., Kimura, H., & Takeda, T. (1989). Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of mice. *Neurobiol Aging*, *11*, 185-192.
- Kharazia, V.N., Schmidt, H.H.H.W., & Weinberg, R.J. (1994). Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum, but not cortex. *Neuroscience*, *62*, 983-987.
- Kidd, E.J., Michel, A.D. & Humphrey, P.P.A. (1995). Autoradiographic distribution of [H-3]L-N-G-nitro-arginine binding in rat brain. *Neuropharmacol*, *34*, 63-73.
- Kitchener, P.D., Vanderzee, C.E.E.M., & Diamond, J. (1993). Lesion-Induced NADPH-Diaphorase Reactivity in Neocortical Pyramidal Neurones. *Neuroreport*, *4*, 487-490.
- Kito, S., Miyoshi, R., & Nomoto, T. (1990). Influence of age on NMDA receptor complex in rat brain studied by in vivo autoradiography. *J Histochem Cytochem*, *38*, 1725-1731.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem J*, *298*, 249-258.

- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M., & Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, *86*, 5159-5162.
- Koh, J.Y., Peters, S., & Choi, D.W. (1986). Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science*, *234*, 73-76.
- Kosaka, T. & Heizmann, C.W. (1989). Selective staining of a population of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Res*, *483*, 158-163.
- Kowall, N.W., & Beal, M.F. (1988). Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, *23*, 105-114.
- Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Beal, M.F., Richardson, E.P., Sofroniew, M.V., Cuello, A.C., & Martin, J.B. (1987). Neuropeptide Y, somatostatin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunohistochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience*, *20*, 817-828.
- Kristensson, K., Aldskogius, M., Peng, Z.C., Olsson, T., Aldskogius, H., & Bentivoglio, M. (1994). Co-induction of neuronal interferon-gamma and nitric oxide synthase in rat motor neurons after axotomy: A role in nerve repair or death?. *J Neurocytol*, *23*, 453-459.
- Kuchiiwa, S., Kuchiiwa, T., Mori, S., & Nakagawa, S. (1994). NADPH-diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. *Neuroreport*, *5*, 1662-1664.
- Kuonen, D.R., Kemp, M.C., & Roberts, P.J. (1988). Demonstration and Biochemical Characterization of Rat Brain NADPH-dependent Diaphorase. *J Neurochem*, *50*, 1017-1025.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., & Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, *89*, 6348-6352.
- Leigh, P.N., Connick, J.H., & Stone, T.W. (1990). Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. *Comp Biochem Physiol*, *97C*, 259-264.

Bibliografia

- Levine, W., Giuditta, A., England, S. & Streckers, H.J. (1960). Brain diaphorases. *J Neurochem*, *6*, 28-36.
- Lin, C.S., Lu, S.M. & Schmechel, D.E. (1986). Glutamic acid decarboxylase and somatostatin immunoreactivities in rat visual cortex. *J comp Neurol*, *244*, 369-383.
- Lou, H.C., Edvinsoon & MacKenzie, E.T. (1987). The concept of coupling blood flow to brain function: revision required?. *Annu Neurol*, *22*, 289-297.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., & Snyder, S. H. (1994). Nitric Oxide - A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med*, *120*, 227-237.
- Lowenstein, C.J., Glatt, C.S., Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, *89*, 6711-6715.
- Lowenstein, C.J., & Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, *70*, 705-707.
- Luebke, J.I., Weider, J.M., McCarley, R.W., & Greene, R.W. (1992). Distribution of NADPH-Diaphorase Positive Somata in the Brainstem of the Monitor Lizard *Varanus-Exanthematicus*. *Neurosci Lett*, *148*, 129-132.
- Lyons, C.R., Orloff, G.J. & Cunningham, J.M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, *267*, 6370-6374.
- Ma, L.J., Ishizaki, Y., Morita, I., & Murota, S.I. (1991). Presence of Nitric Oxide Synthase Activity in the Neurons of the Rat Embryonal Cerebrum. *Neurosci Lett*, *132*, 23-25.
- Malatino, L.S., Giuffrida, R., Bellomo, M., Digrande, A., & Sapienza, S. (1993). Altered Histochemical Staining with Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Diaphorase in Mongolian Gerbil Brain After Cerebral Ischemia. *J Hypertension*, *11*, S164-S165.
- Matsumoto, T., Nakane, M., Pollock, J.S., Kuk, J.E., & Forstermann, U. (1993). A Correlation Between Soluble Brain Nitric Oxide Synthase and NADPH-Diaphorase Activity Is Only Seen After Exposure of the Tissue to Fixative. *Neurosci Lett*, *155*, 61-64.

- McDonald, A.J., Payne, D.R., & Mascagni, F. (1993). Identification of Putative Nitric Oxide Producing Neurons in the Rat Amygdala Using NADPH-Diaphorase Histochemistry. *Neuroscience*, *52*, 97-106.
- Meinecke, D.L. & Peters, A. (1987). GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J comp Neurol*, *261*, 388-404.
- Meldrum, B., & Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, *11*, 379-387.
- Mellgren, S.I. (1973). Distribution of succinate-, alfa-glycerophosphate-, NADH-, and NADPH dehydrogenases (tetrazolium reductases) in the hippocampal region of the rat during postnatal development. *Z Zellforsh*, *141*, 347-373.
- Meyer, G., González Hernández, T., Galindo Mireles, D., Castañeyra Perdomo, A., & Ferrer Torres, R. (1991). The Efferent Projections of Neurons in the White Matter of Different Cortical Areas of the Adult Rat. *Anat Embryol*, *184*, 99-102.
- Miki, N., Kawabe, Y. & Kuriyama, K. (1977). Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm*, *75*, 851-855.
- Minc-Golomb, D., Tsarfaty, I., & Schwartz, J.P. (1994). Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol*, *112*, 720-722.
- Miyagawa, A., Okamura, H., & Ibata, Y. (1994). Coexistence of Oxytocin and NADPH-Diaphorase in Magnocellular Neurons of the Paraventricular and the Supraoptic Nuclei of the Rat Hypothalamus. *Neurosci Lett*, *171*, 13-16.
- Mizukawa, K., McGeer, P.L., Vincent, S.R., & McGeer, E.G. (1988_a). Ultrastructure of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase-positive neurons in the cat cerebral cortex, amygdala and caudate nucleus. *Brain Res*, *452*, 286-292.
- Mizukawa, K., McGeer, P.L., Vincent, S.R., & McGeer, E.G. (1989). Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphat diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J comp Neurol*, *279*, 281-311.
- Mizukawa, K., Vincent, S.R., McGeer, P.L., & McGeer, E.G. (1988_b). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase-positive neurons in cat cerebral white matter. *Brain Res*, *461*, 274-281.

Bibliografía

- Mollace, V., Rodino, P., Massoud, R., Rotitori, D. & Nistico, G. (1995). Age-dependent changes of NO synthase activity in the rat brain. *Biochem and Biophys Res Comm*, 215, 822-827.
- Moncada, S., Higgs, E.A., Hodson, H.F., Knowles, R.G., Lopezjaramillo, P., McCall, T., Palmer, R.M.J., Radomski, M.W., Rees, D.D., & Schulz, R. (1991a). The L-Arginine - Nitric Oxide Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17, S1-S9.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., & Higgs, E.A. (1991b). Nitric Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142.
- Mufson, E.J., Brady, D.R., & Carey, R.G. (1990). Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Diaphorase (NADPH-D) Histochemistry in the Hippocampal Formation of the New World Monkey (Saimiri-Sciureus). *Brain Res*, 516, 237-247.
- Nakos, G., & Gossrau, R. (1994). When NADPH diaphorase (NADPHd) works in the presence of formaldehyde, the enzyme appears to visualize selectively cells with constitutive nitric oxide synthase (NOS). *Acta Histochem*, 96, 335-343.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6, 3051-3064.
- Nathan, C. & Xie, Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78, 915-918.
- Nisbet, A.P., Foster, O.J.F., Kingsbury, A., Lees, A.J., & Marsden, C.D. (1994). Nitric Oxide Synthase Mrna Expression in Human Subthalamic Nucleus, Striatum and Globus Pallidus - Implications for Basal Ganglia Function. *Mol Brain Res*, 22, 329-332.
- Norris, P.J., Hardwick, J.P., & Emson, P.C. (1994). Localization of NADPH cytochrome P450 oxidoreductase in rat brain by immunohistochemistry and in situ hybridization and a comparison with the distribution of neuronal NADPH-diaphorase staining. *Neuroscience*, 61, 331-350.
- O'Dell, T. J., Huang, P. L., Dawson, T. M., Dinerman, J. L., Snyder, S. H., Kandel, E. R., & Fishman, M. C. (1994). Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*, 265, 542-546.
- Ogilvie, P., Schilling, K., Billingsley, M.L. & Schmidt, H.H.H.W. (1995). Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASB J*, 9, 799-806.

- Ogura, T., Yokoyama, T., Fujisawa, H., Kurashima, Y., & Esumi, H. (1993). Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, *193*, 1014-1022.
- Okamura, H., Yokosuka, M., & Hayashi, S. (1994). Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J Neuroendocrinol*, *6*, 597-601.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., & Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesized nitric oxide from L-arginine. *Nature*, *333*, 664-666.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*, 524-526.
- Papadopoulos, G.C., Parnavelas, J.G. & Cavanagh, M.E. (1987). Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res*, *420*, 95-99.
- Pasqualotto, B.A., & Vincent, S.R. (1991). Galanin and NADPH-Diaphorase Coexistence in Cholinergic Neurons of the Rat Basal Forebrain. *Brain Res*, *551*, 78-86.
- Peng, Z.C., Chen, S., Bertini, G., Schmidt, H.H.H.W., & Bentivoglio, M. (1994). Co-Localization of Nitric Oxide Synthase and NGF Receptor in Neurons in the Medial Septal and Diagonal Band Nuclei of the Rat. *Neurosci Lett*, *166*, 153-156.
- Peters, A. & Regidor, J. (1981). A reassessment of the forms of non-pyramidal neurons in Area 17 of cat visual cortex. *J. comp Neurol*, *203*, 685-716.
- Peunova, N., & Enikolopov, G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature*, *375*, 68-73.
- Poeggel, G., Muller, M., Seidel, I., Rechartdt, L., & Bernstein, H.G. (1992). Histochemistry of Guanylate Cyclase, Phosphodiesterase, and NADPH Diaphorase (Nitric Oxide Synthase) in Rat Brain Vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol*, *20*, S76-S79.
- Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H.W., Nakane, M., & Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*, 10480-10484.

Bibliografía

- Porter, T.D. & Kasper, C.B. (1985). Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, *82*, 973-977.
- Ravindranath, V., Anandatheertavarada, H.K. & Shankar, S.K. (1990). NADPH cytochrome P450 reductase in rat, mouse and human brain. *Biochem Pharmacol*, *39*, 1013-1018.
- Regidor, J., Edvinsson, L., & Divac, I. (1993_a). NOS Neurones Lie Near Branchings of Cortical Arteriolar. *Neuroreport*, *4*, 112-114.
- Regidor, J., Montesdeoca, J., Ramírez González, J.A., Hernández Urquía, C.M., & Divac, I. (1993_b). Bilateral Induction of NADPH-Diaphorase Activity in Neocortical and Hippocampal Neurons by Unilateral Injury. *Brain Res*, *631*, 171-174.
- Regidor, J., Montesdeoca, J., Ramírez González, J.A., Sosa Pérez, C.D., Hernández Urquía, C.M., Feria, M., & Divac, I. (1994). Anti-inflammatory drugs suppress injury-induced NADPH-d activity in CA1 pyramidal neurones. *Neuroreport*, *5*, 1766-1768.
- Regidor, J. & Poch, L. (1987). Histochemical analysis of the lizard cortex: an acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. En: *The Forebrain of Reptiles*. pp 77-84. Schwerdtfeger, W.K. & Smeets, W.J.A.J. (Eds.). Karger, Basel.
- Rengasamy, A., & Johns, R.A. (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol*, *44*, 124-128.
- Rodrigo, J., Springall, D.R., Uttenthal, O., Bentura, M.L., Abadia Molina, F., Riveros Moreno, V., Martínez Murillo, R., Polak, J.M., & Moncada, S. (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]*, *345*, 175-221.
- Rogers, N. E., & Ignarro, L. J. (1992). Constitutive Nitric Oxide Synthase from Cerebellum Is Reversibly Inhibited by Nitric Oxide Formed from L-Arginine. *Biochem Biophys Res Commun*, *189*, 242-249.
- Ruan, R.S., Leong, S.K., & Yeoh, K.H. (1994). Expression of NADPH-diaphorase activity in the facial motoneurons after compression of the facial nerve in the albino rat. *Brain Res*, *652*, 350-352.

- Sajin, B., Sestan, N., & Dmitrovic, B. (1992). Compartmentalization of NADPH-diaphorase staining in the developing human striatum. *Neurosci Lett*, *140*, 117-120.
- Samama, B., Chateau, D., & Boehm, N. (1995). Expression of NADPH-diaphorase in the rat forebrain during development. *Neurosci Lett*, *184*, 204-207.
- Sandell, J.H. (1986). NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex. *J comp Neurol*, *251*, 388-397.
- Sangruchi, T., & Kowall, N.W. (1991). NADPH Diaphorase Histochemistry of the Human Hypothalamus. *Neuroscience*, *40*, 713-724.
- Scherer-Singler, U., Vincent, S.R., Kimura, H., & McGeer, E.G. (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Meth*, *9*, 229-234.
- Schmidt, H.H.H.W., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J.S., Miller, M.F. & Murad, F. (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggest frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem*, *40*, 1439-1456
- Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Nakane, M., Gorsky, L.D., Forstermann, U. & Murad, F. (1991). Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*, 365-369.
- Schober, A., Brauer, K., & Luppia, H. (1989). Alternate coexistence of NADPH-diaphorase with choline acetyltransferase or somatostatin in the rat neostriatum and basal forebrain. *Acta Histochem Cytochem*, *22*, 669-674.
- Schuman, E.M. & Madison, D.V. (1994). Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, *17*, 153-183.
- Sessa, W.C., Harrison, J.K., Luthin, D.R., Pollock, J.S., & Lynch, K.R. (1993). Genomic Analysis and Expression Patterns Reveal Distinct Genes for Endothelial and Brain Nitric Oxide Synthase. *Hypertension*, *21*, 934-938.
- Shibuki, K. & Okada, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, *349*, 326-328.
- Siegelbaum, S.A., & Kandel, E.R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, *1*, 113-120.

Bibliografía

- Silver, I.A. (1978). Cellular microenvironment in relation to local blood flow. En: *Cerebral vascular smooth muscle and its control. Ciba Foundation Symposium 56*, pp. 49-61. Elliot, K. & O'Connor, M. (Eds.). Elsevier, New York.
- Sims, K.L., Kauffman, F.C., Johnson, E.C., & Pickel, V.M. (1974). Cytochemical localization of brain nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)-dependent dehydrogenases. *J Histochem Cytochem*, 22, 7-19.
- Sims, K.S. & Williams, R.S. (1990). The human amygdaloid complex: A cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience*, 36, 449-472.
- Snyder, S.H., & Bredt, D.S. (1991). Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 125-128.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., et al. (1977). The [¹⁴C]-deoxyglucose method for measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, 28, 897-916.
- Solodkin, A., Traub, R.J., & Gebhart, G.F. (1992). Unilateral Hindpaw Inflammation Produces a Bilateral Increase in NADPH-Diaphorase Histochemical Staining in the Rat Lumbar Spinal Cord. *Neuroscience*, 51, 495-499.
- Somogyi, P., Hodgson, A.J., Smith, A.D., Nunzi, M.G., Gorio, A. & Wu, J.Y. (1984). Different populations of gabaergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci*, 4, 2590-2603.
- Southam, E., Morris, R., & Garthwaite, J. (1992). Sources and targets of nitric oxide in rat cerebellum. *Neurosci Lett*, 137, 241-244.
- Squadrito, F., Calapai, G., Altavilla, D., Cucinotta, D., Zingarelli, B., Campo, G.M., Arcoraci, V., Sautebin, L., Mazzaglia, G., & Caputi, A.P. (1994). Food Deprivation Increases Brain Nitric Oxide Synthase and Depresses Brain Serotonin Levels in Rats. *Neuropharmacology*, 33, 83-86.
- Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W.A., Brill, T., Siewert, J.R., Greim, H. & Doehmer, J. (1994). Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 3559-3563.

- Stamler, J.S. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, *78*, 931-936.
- Steele, J.E., Palmer, A.M., Stratmann, G.C., & Bowen, D.M. (1989). The N-methyl-D-aspartate receptor complex in Alzheimer's disease. Reduced regulation by glycine but not zinc. *Brain Res*, *500*, 369-373.
- Stuehr, D.J. & Griffith, O.W. (1992). Mammalian nitric oxide synthases. *Advan Enzymol*, *65*, 287-346.
- Sugaya, K., & McKinney, M. (1994). Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Cholinergic Neurons in the Rat Brain Examined by Combined Immunocytochemistry and In situ Hybridization Histochemistry. *Mol Brain Res*, *23*, 111-125.
- Thomas, E., & Pearse, A.G.E. (1961). The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie*, *2*, 266-282.
- Thomas, E., & Pearse, A.G.E. (1964). The solitary active cells: histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with TPN-diaphorase reaction. *Acta Neuropath*, *3*, 238-249.
- Toda, N., & Okamura, T. (1991). Role of Nitric Oxide in Neurally Induced Cerebroarterial Relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*, *258*, 1027-1032.
- Tomic, D., Zobundzija, M., & Meaugorac, M. (1994). Postnatal development of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) positive neurons in rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, *170*, 217-220.
- Tracey, W.R., Nakane, M., Pollock, J.S., & Forstermann, U. (1993). Nitric Oxide Synthases in Neuronal Cells, Macrophages and Endothelium Are NADPH Diaphorases, But Represent Only a Fraction of Total Cellular NADPH Diaphorase Activity. *Biochem Biophys Res Commun*, *195*, 1035-1040.
- Traub, R.J., Solodkin, A., & Gebhart, G.F. (1994). NADPH-diaphorase histochemistry provides evidence for a bilateral, somatotopically inappropriate response to unilateral hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res*, *647*, 113-123.
- Umans, J., & Levi, R. (1995). Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol*, *57*, 771-790.

Bibliografia


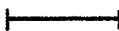

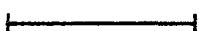




- Unger, J.W., & Lange, W. (1992). NADPH-diaphorase-positive cell populations in the human amygdala and temporal cortex: neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *83*, 636-646.
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Kharazia, V.N., Nakane, M., & Schmidt, H.H.H.W. (1993). Neurons in Rat Hippocampus That Synthesize Nitric Oxide. *J comp Neurol*, *331*, 111-121.
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Kharazia, V.N., Schmidt, H.H.H.W., Nakane, M., & Rustioni, A. (1993). Neurons in Rat Cerebral Cortex That Synthesize Nitric Oxide -NADPH Diaphorase Histochemistry, NOS Immunocytochemistry, and Colocalization with GABA. *Neurosci Lett*, *157*, 157-161.
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Rustioni, A., & Schmidt, H.H.H.W. (1992). Nitric Oxide Synthase and GABA Colocalize in Lamina-II of Rat Spinal Cord. *Neurosci Lett*, *148*, 6-10.
- Vaney, D.I., & Young, H.M. (1988). GABA-like immunoreactivity in NADPH-diaphorase amacrine cells of the rabbit retina. *Brain Res*, *474*, 380-385.
- Vercelli, A.E., & Cracco, C.M. (1994). Effects of eye enucleation on NADPH-diaphorase positive neurons in the superficial layers of the rat superior colliculus. *Dev Brain Res*, *83*, 85-98.
- Verge, V.M.K., Xu, Z., Xu, X.J., Wiesenfeldhallin, Z., & Hokfelt, T. (1992). Marked Increase in Nitric Oxide Synthase messenger RNA in Rat Dorsal Root Ganglia After Peripheral Axotomy - In situ Hybridization and Functional Studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, *89*, 11617-11621.
- Villar, M.J., Ceccatelli, S., Bedecs, K., Bartfai, T., Bredt, D., Snyder, S.H., & Hokfelt, T. (1994). Upregulation of nitric oxide synthase and galanin message-associated peptide in hypothalamic magnocellular neurons after hypophysectomy. Immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Brain Res*, *650*, 219-228.
- Vincent, S.R. (1986). NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. En: *Neurochemistry: Modern Methods and Applications*, pp. 375-396. Panula, P., Paivarinta, H. & Soinila, S. (Eds.). *Alan R. Liss. New York*.
- Vincent, S.R. & Hope, B.T. (1992). Neurons that say NO. *Trends Neurosci*, *15*, 108-113.

- Vincent, S.R., & Johansson, O. (1983). Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *J comp Neurol*, *217*, 264-270.
- Vincent, S.R., Johansson, O., Hokfelt, T., Skirboll, L., Elde, R.P., Terenius, L., Kimmel, J., & Goldstein, M. (1983). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J comp Neurol*, *217*, 252-263.
- Vincent, S.R., & Kimura, H. (1992). Histochemical Mapping of Nitric Oxide Synthase in the Rat Brain. *Neuroscience*, *46*, 755-784.
- Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G., & Moncada, S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 5212-5216.
- Wendland, B., Schweizer, F.E., Ryan, T.A., Nakane, M., Murad, F., Scheller, R.H., & Tsien, R.W. (1994). Existence of Nitric Oxide Synthase in Rat Hippocampal Pyramidal Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 2151-2155.
- Wetts, R., & Vaughn, J.E. (1993). Transient Expression of beta-NADPH Diaphorase in Developing Rat Dorsal Root Ganglia Neurons. *Dev Brain Res*, *76*, 278-282.
- White, E.L. (1989). Cortical circuits. *Birkhäuser. Boston*.
- Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C. & Nims, R.W. (1993). Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Bioph*, *300*, 115-123.
- Wolf, G., Wurdig, S., & Schunzel, G. (1992). Nitric Oxide Synthase in Rat Brain Is Predominantly Located at Neuronal Endoplasmic Reticulum - An Electron Microscopic Demonstration of NADPH-Diaphorase Activity. *Neurosci Lett*, *147*, 63-66.
- Wu, W.T. (1993). Expression of Nitric-Oxide Synthase (NOS) in Injured CNS Neurons as Shown by NADPH Diaphorase Histochemistry. *Exp Neurol*, *120*, 153-159.
- Wu, W.T., & Scott, D.E. (1993). Increased Expression of Nitric Oxide Synthase in Hypothalamic Neuronal Regeneration. *Exp Neurol*, *121*, 279-283.

Bibliografia

- Wu, W.T., Liuzzi, F.J., Schinco, F.P., Depto, A.S., Li, Y., Mong, J.A., Dawson, T.M., & Snyder, S.H. (1994). Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience*, *61*, 719-726.
- Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A. Troso, T. & Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, *256*, 225-228.
- Yan, X.X., Garey, L.J., & Jen, L.S. (1994). Development of NADPH-diaphorase activity in the rat neocortex. *Dev Brain Res*, *79*, 29-38.
- Yu, W.H.A. (1994). Nitric Oxide Synthase in Motor Neurons After Axotomy. *J Histochem Cytochem*, *42*, 451-457.
- Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., & Snyder, S.H. (1994). Nitric Oxide Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Neurotoxicity. *Science*, *263*, 687-689.
- Zhang, J. & Snyder, S.H. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *35*, 213-233.
- Zhang, W., López-Figueroa, M.O., Regidor, J., Divac., I., & Edvinsson, L. (1995b). Nitric oxide synthase-containing neurons innervate human and rat intracortical microvessels. *Cell Vision*, *2*, 105-110.
- Zilles, K. (1985). The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. *Springer-Verlag, Berlin*.

7. Iconografía

Escalas	Figuras
 1mm	1-11
 100 μ m	12-30
 100 μ m	31-65; 170-173 175-179; 183-182 192-207; 209-225
 200 μ m	163-169; 174; 180
 1 mm	181
 1 mm	184
 1 mm	185-191
 50 μ m	208

Neuropilo

Animales adultos

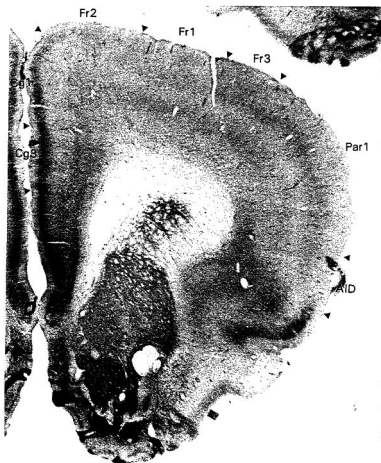


Fig. 1: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma 2.2 mm.

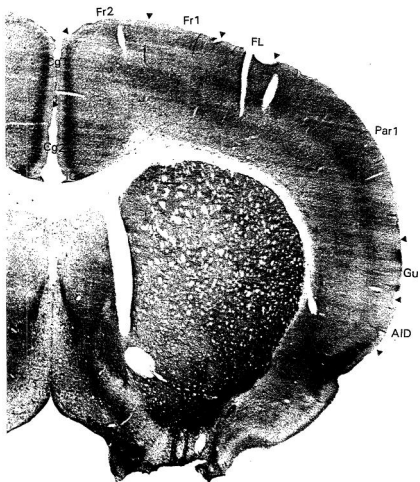


Fig. 2: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma 0.7 mm.

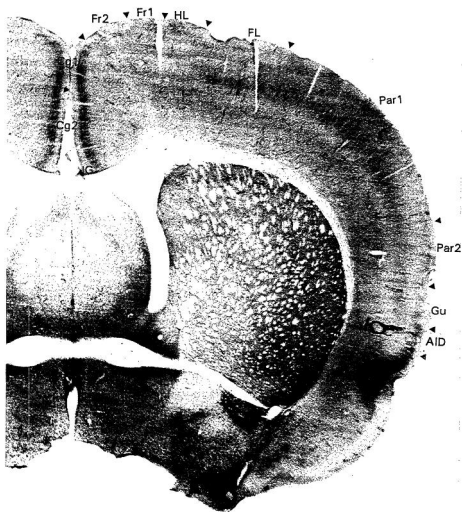


Fig. 3: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma-0.3 mm.

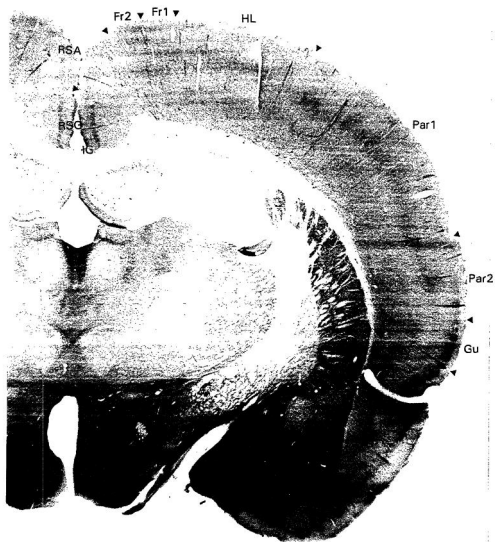


Fig. 4: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -1.8 mm.



Fig. 5: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -3.3 mm.

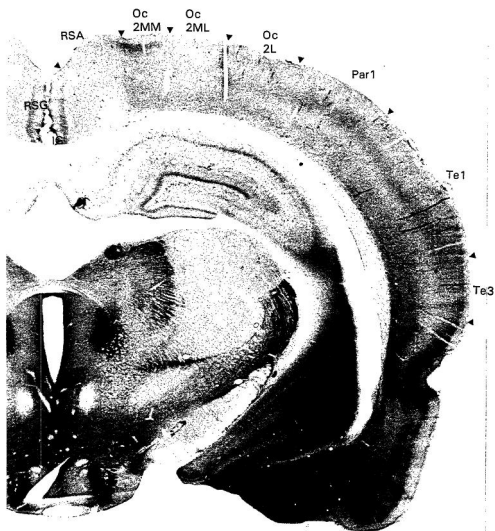


Fig. 6: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -4.3 mm.

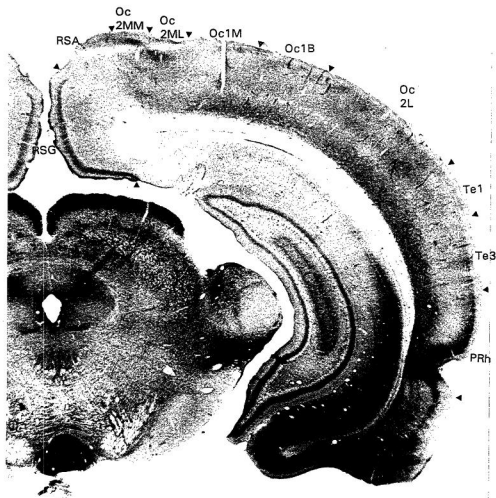


Fig. 7: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -5.8 mm.

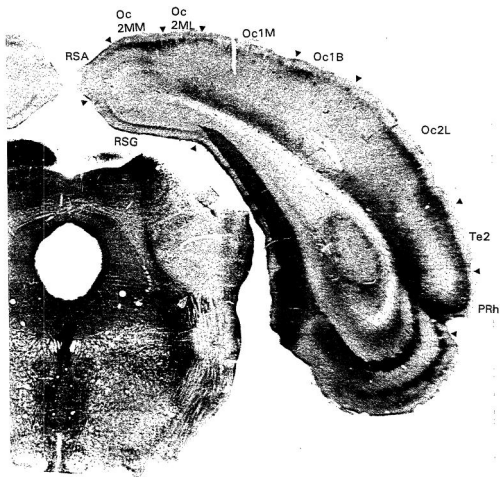


Fig. 8: Animal adulto. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -7.3 mm.

Animales viejos

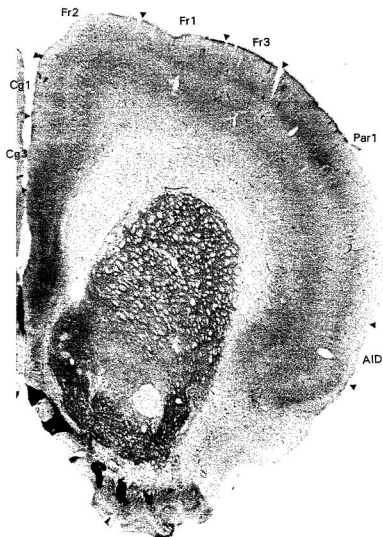


Fig. 9: Animal viejo. Visión general de un corte realizado aproximadamente entre los niveles Bregma 2.2 mm. y Bregma 1.7 mm.



Fig. 10: Animal viejo. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -0.3 mm.



Fig. 11: Animal viejo. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -2.3 mm.



Fig. 12: Animal viejo. Visión general de un corte realizado aproximadamente a nivel Bregma -5.8 mm.

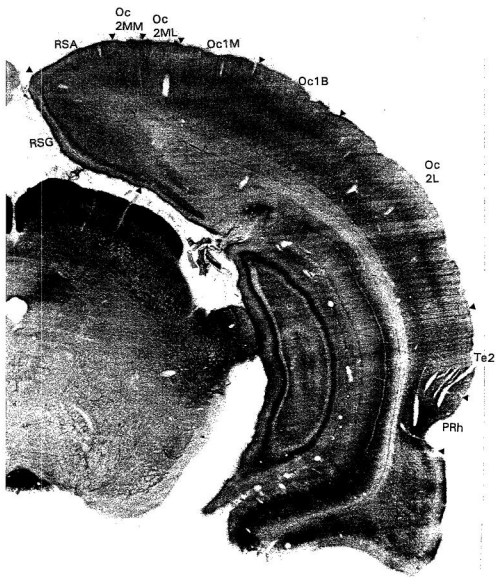


Fig. 13: Animal viejo. Visión general de un corte realizado aproximadamente entre los niveles Bregma -6.3 mm. y Bregma -6.8 mm.

Animales adultos

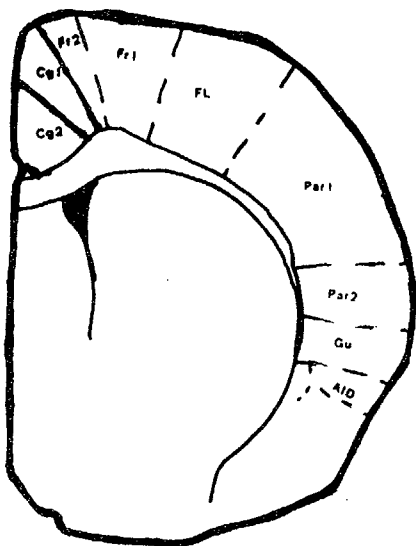
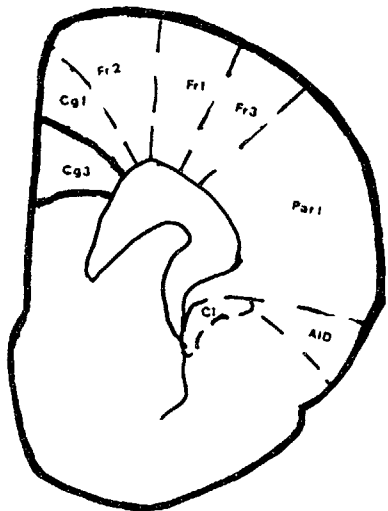




Fig. 14: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Cg₃.

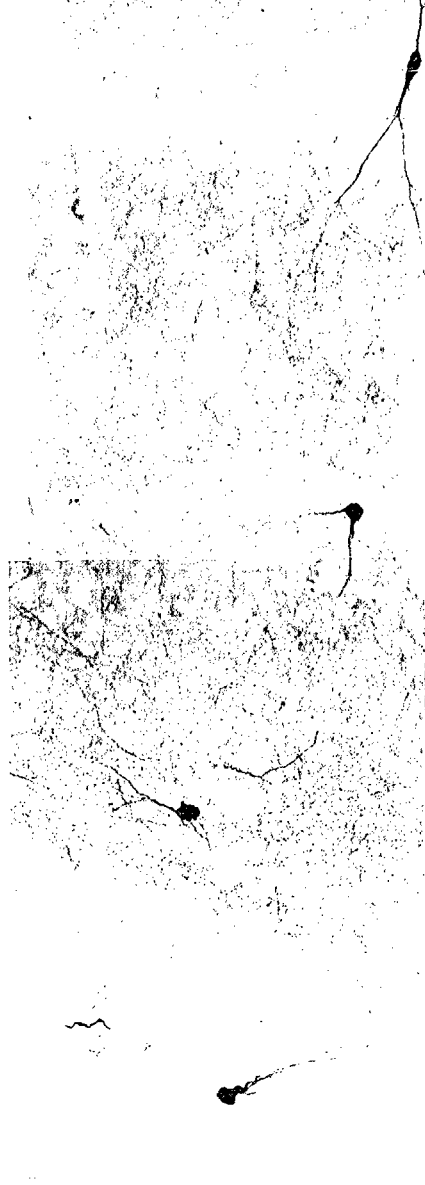


Fig. 15: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Cg₂.

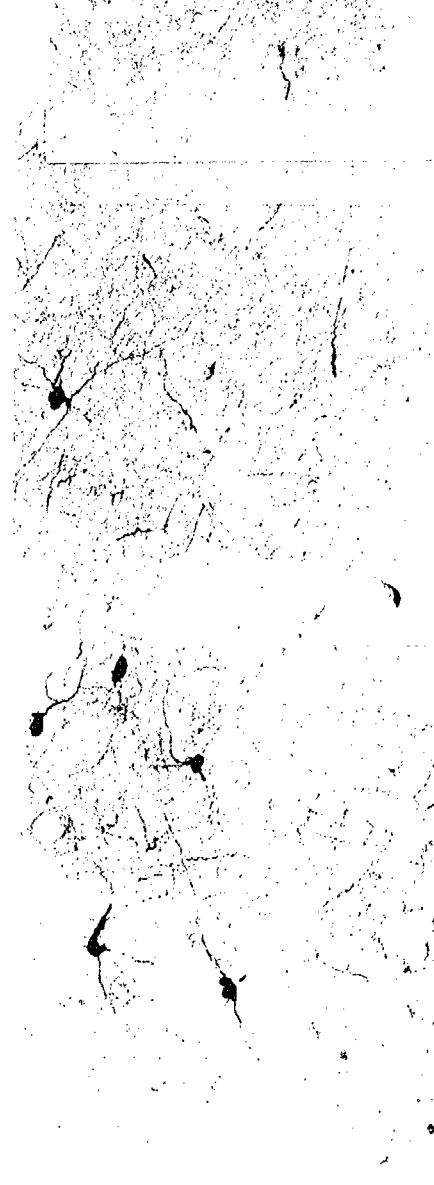


Fig. 16: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Cg₁.

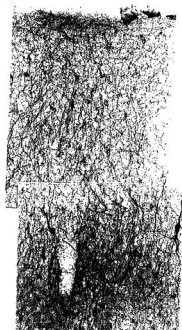
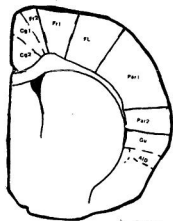
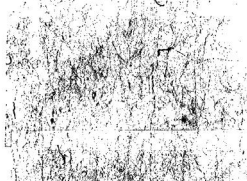
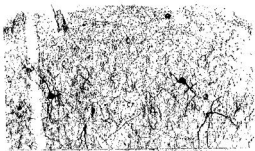
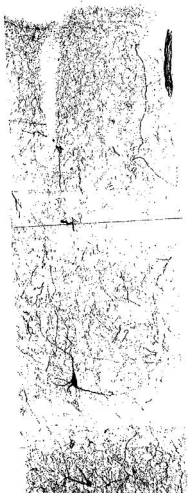


Fig. 17: Animal adulto. Visión general del neuropilo de las áreas Motoras.

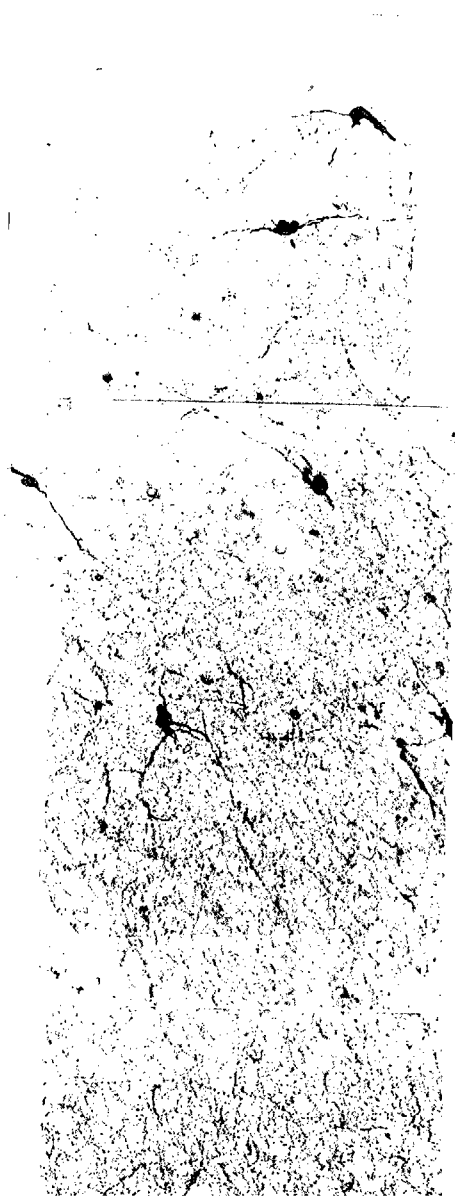


Fig. 18: Adulto. Visión general del neuropilo del área parietal. Región de los "barrell".

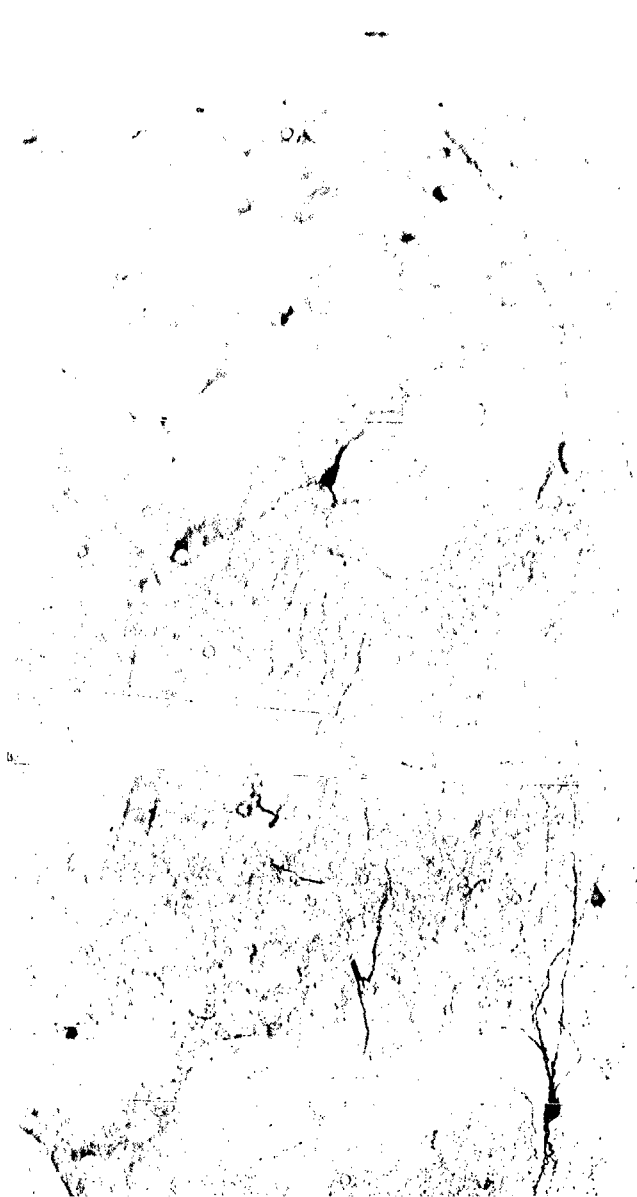
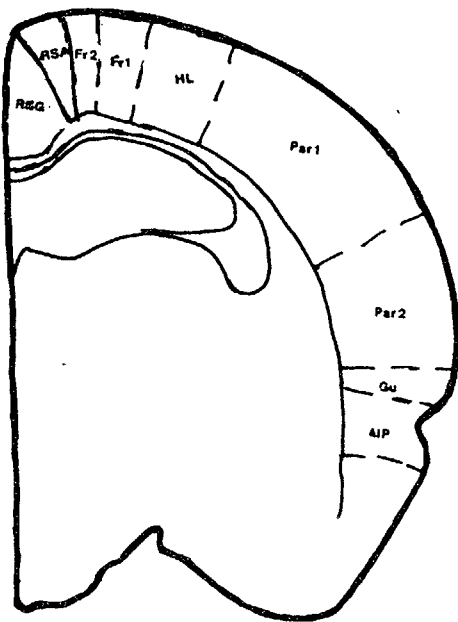
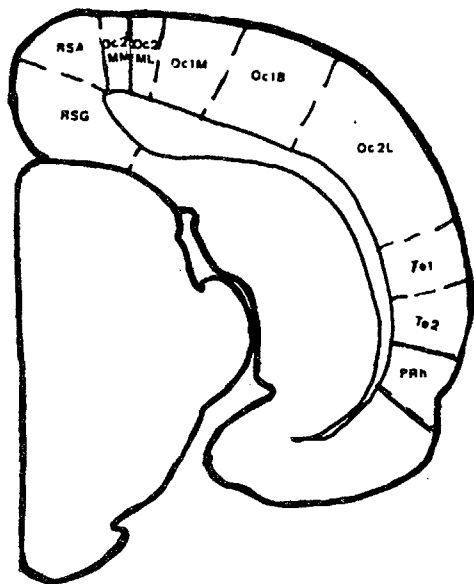


Fig. 19: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Parietal. Región lateral.





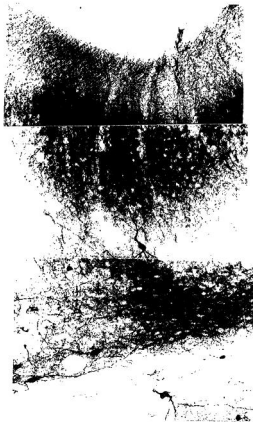


Fig. 20: Animal adulto. Visión general del neuropilo de las áreas Perirhinales.

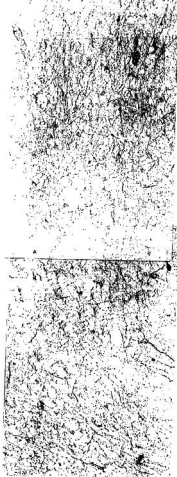
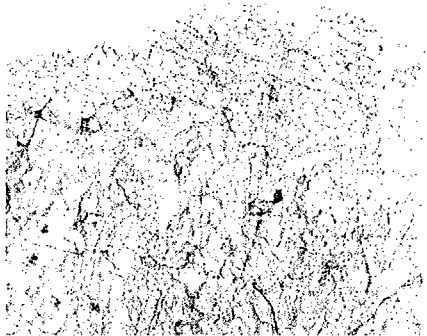
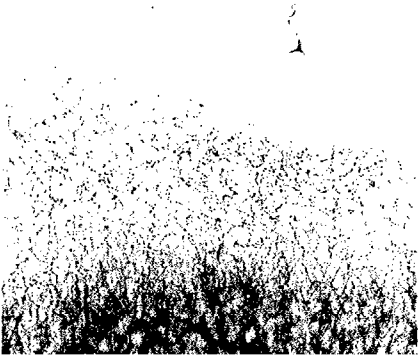
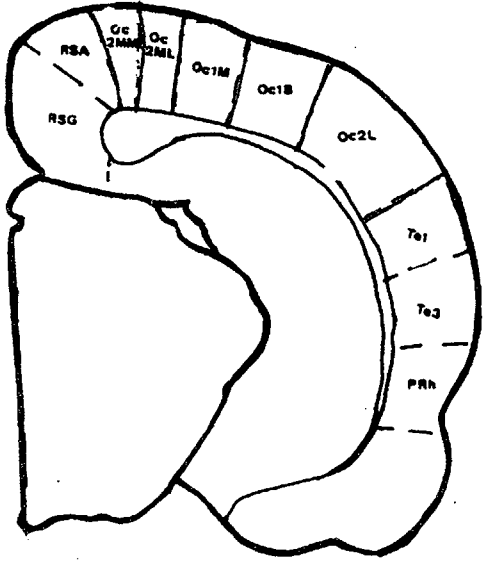


Fig. 21: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área RSG.



Fig. 22: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área RSA.



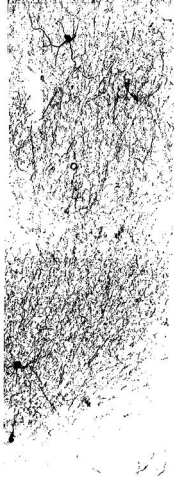


Fig. 23: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Oc_{2M}.

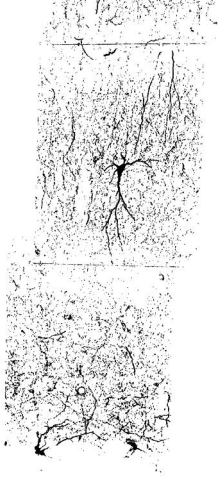


Fig. 24: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Oc₁.

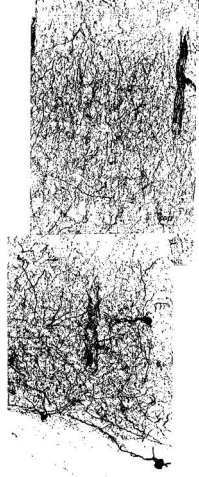


Fig. 25: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Oc_{2L}.

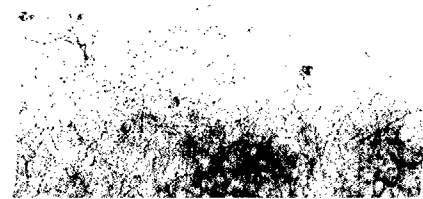
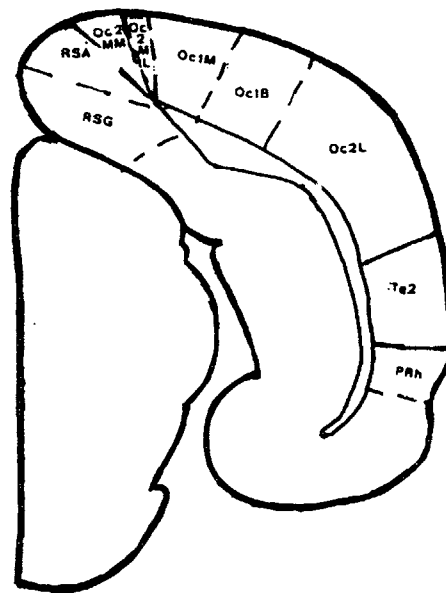
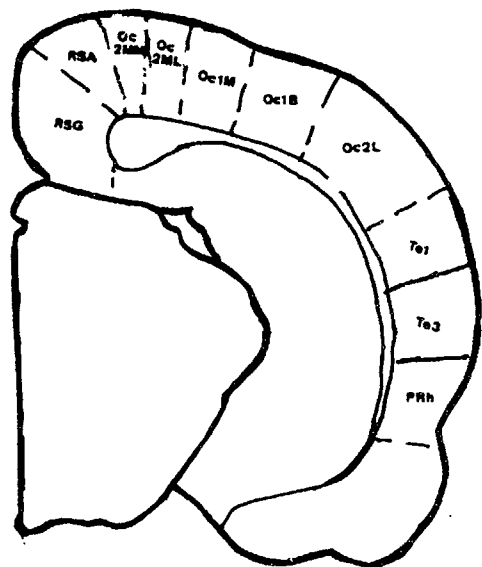




Fig. 26: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Te_3 .

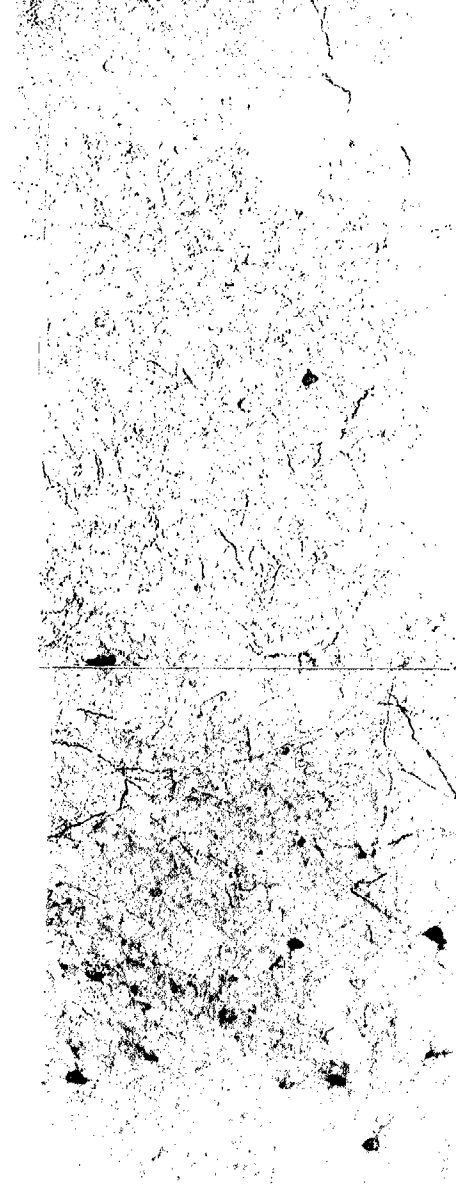
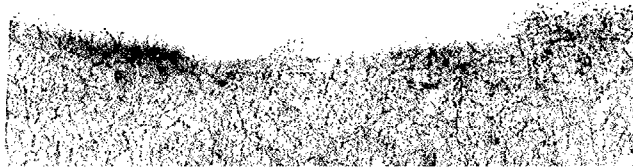
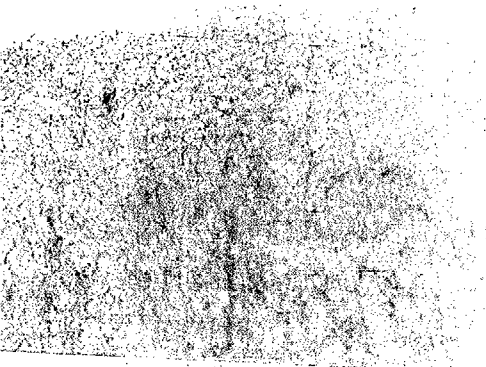
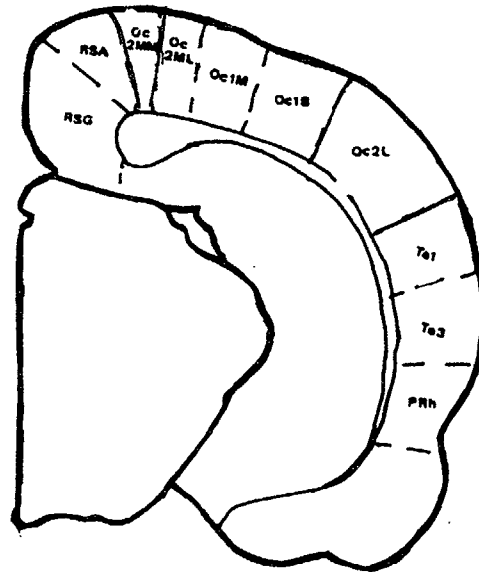
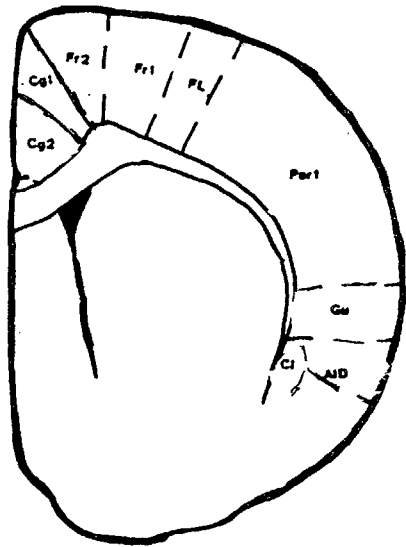


Fig. 27: Animal adulto. Visión general del neuropilo del área Te_2 .

Animales viejos



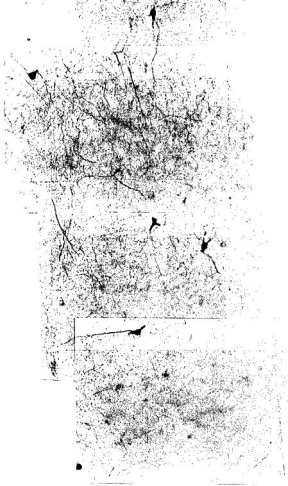


Fig. 28: Animal viejo. Visión general del neuropilo del área Cg₁.

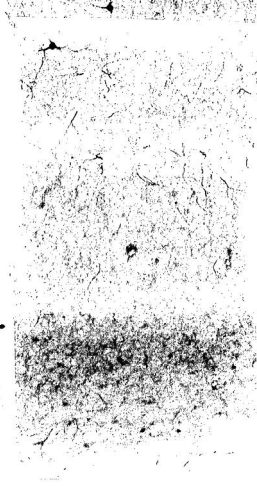


Fig. 29: Animal viejo. Visión general del neuropilo del área Oc_{2M}.



Fig. 30: Animal viejo. Visión general del neuropilo del área Oc_{2L}.

Tipos neuronales

Animales adultos

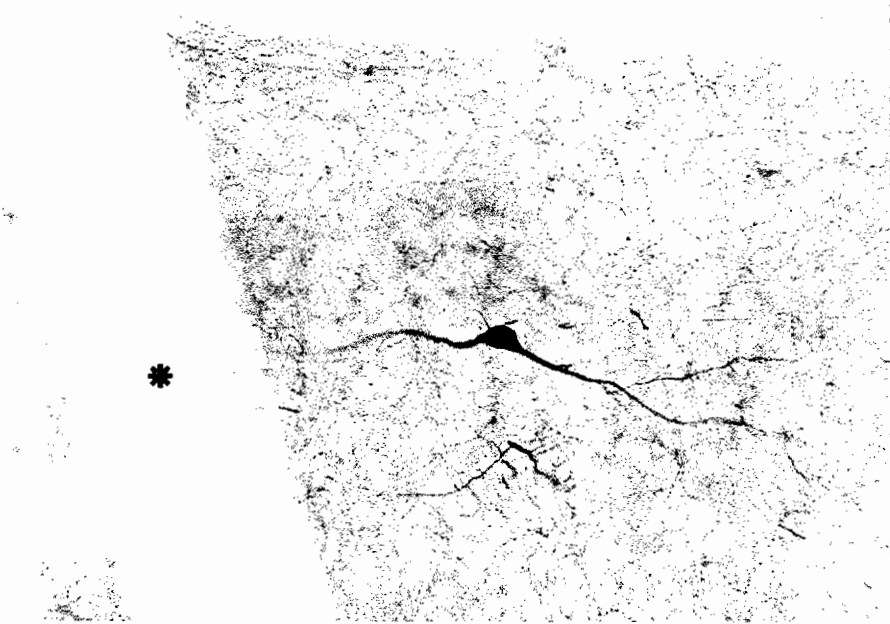


Fig. 31: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme y pequeño. Orientación horizontal. Pocas ramificaciones dendríticas. Área Oc_1 , Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido. (* vaso sanguíneo).

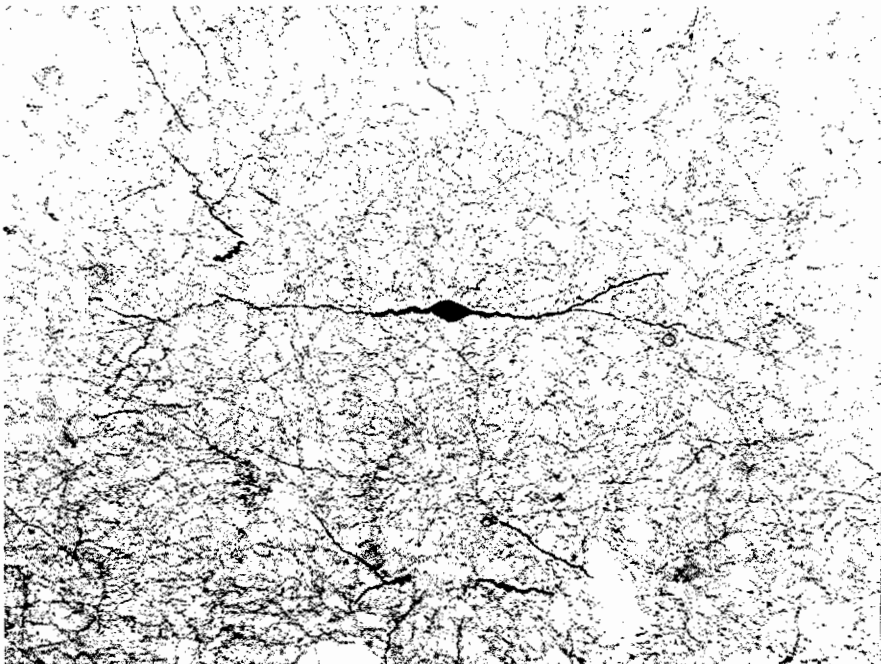


Fig. 32: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Orientación horizontal y escasas ramificaciones. Área Oc_2 , Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

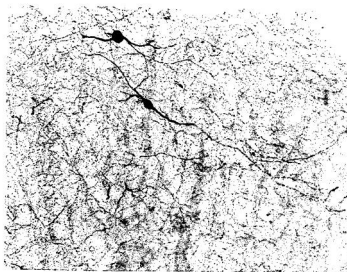


Fig. 33: Neuronas bipolares. Cuerpo fusiforme y globoso. Orientación oblicua y horizontal. Pocas ramificaciones dendríticas. Área Par₂. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehído.

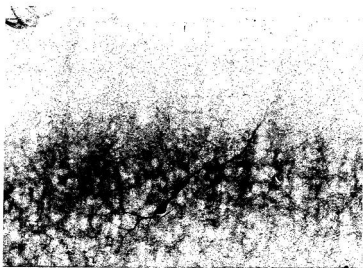


Fig. 34: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Orientación horizontal algo oblicua y escasas ramificaciones. Área Cg₃. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehído.

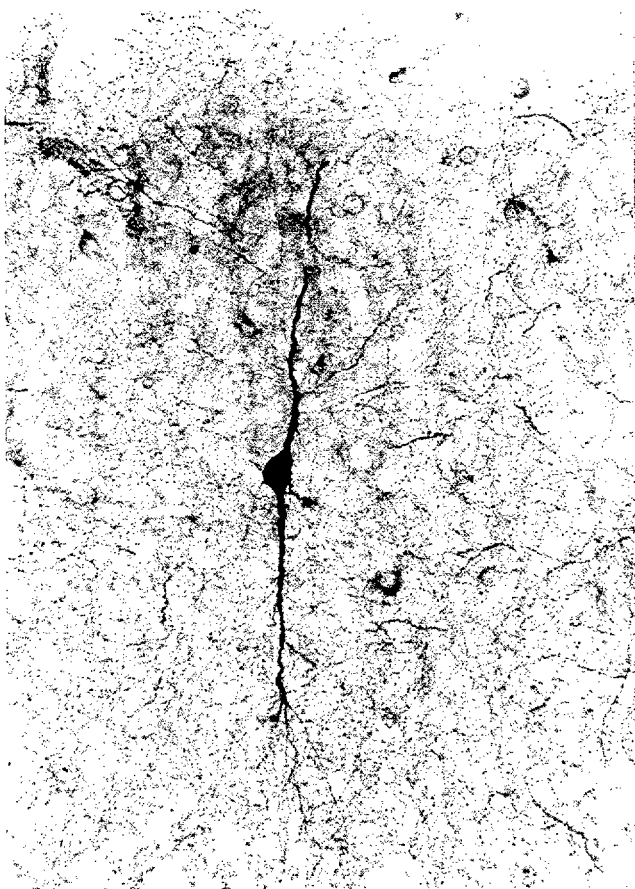


Fig. 35: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme algo globoso. Orientación vertical y pocas ramificaciones. Área Te. Capa II/III. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 36: Neurona bipolar. Cuerpo globoso. Orientación vertical y amplia ramificación. Área Te. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.



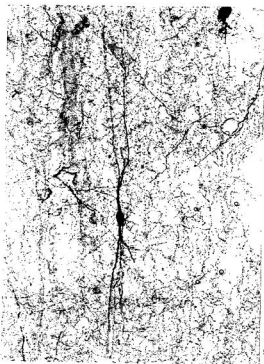
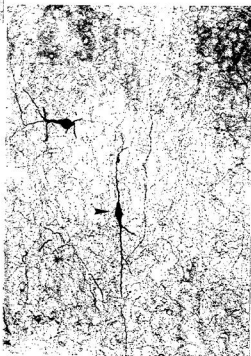


Fig. 37: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Orientación vertical y con ramificaciones. Área HI. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 38: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Orientación vertical y escasa ramificación. Área Gu. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.



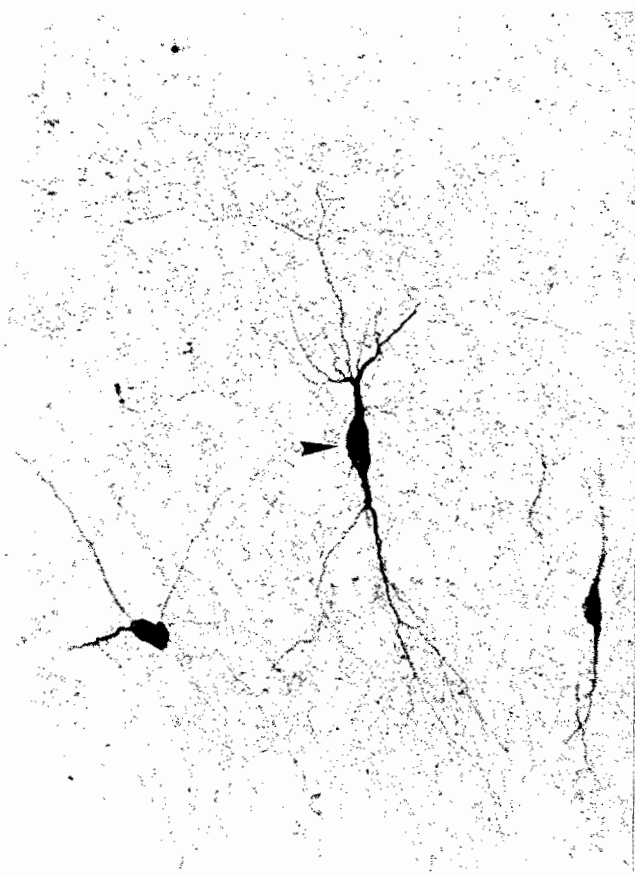
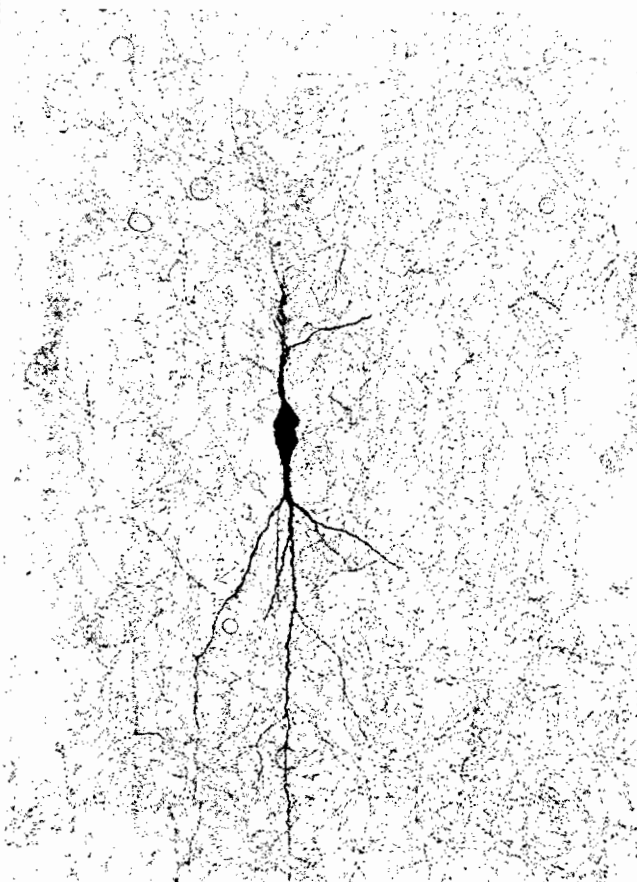


Fig. 39: Neurona bipolar. Cuerpo más o menos fusiforme. Orientación vertical y con el tronco dendrítico apical bien desarrollado. Área Cg₁. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 40: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme con cierta irregularidad. Orientación vertical. Tronco dendrítico basal muy ramificado. Área Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.



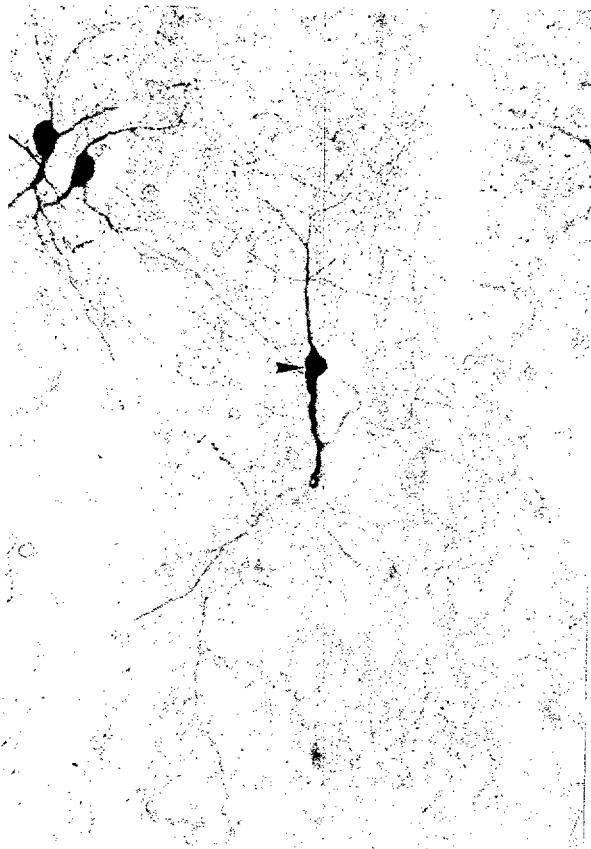
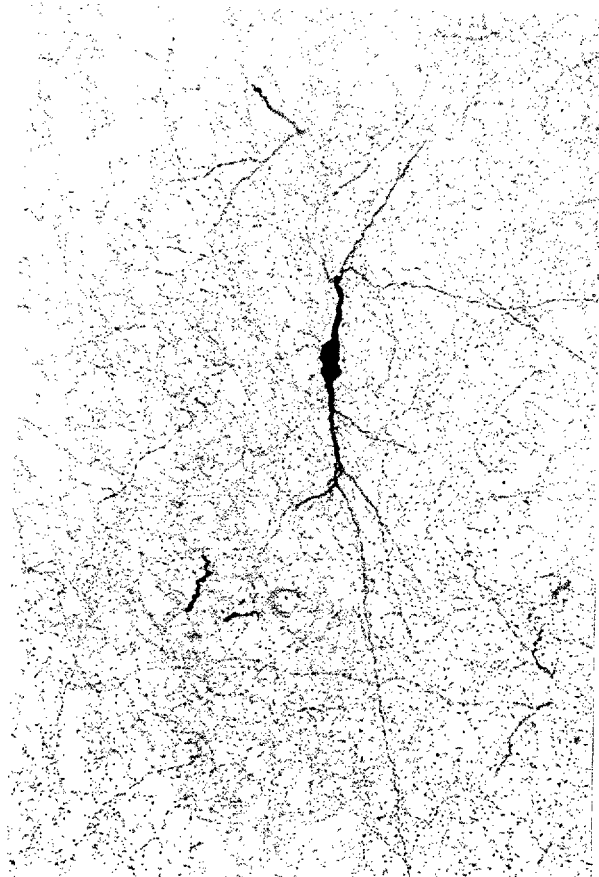


Fig. 41: Neurona bipolar. Cuerpo irregular. Orientación vertical y escasas ramificaciones. Área Te₁. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 42: Neurona bipolar. Cuerpo irregular. Orientación vertical y con ramificaciones. Área Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.



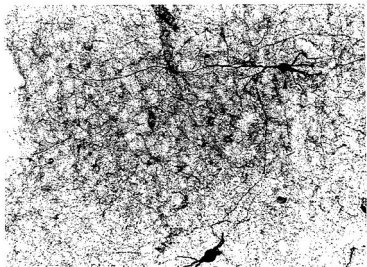


Fig. 43: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme, pequeño. Orientación horizontal con un tronco dendrítico más ramificado. Área Te₁, Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

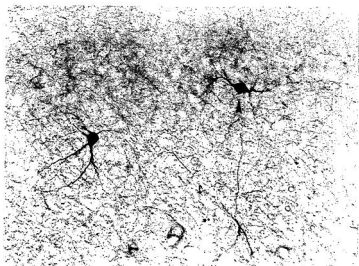


Fig. 44: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Orientación horizontal. Área Cg₁, Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

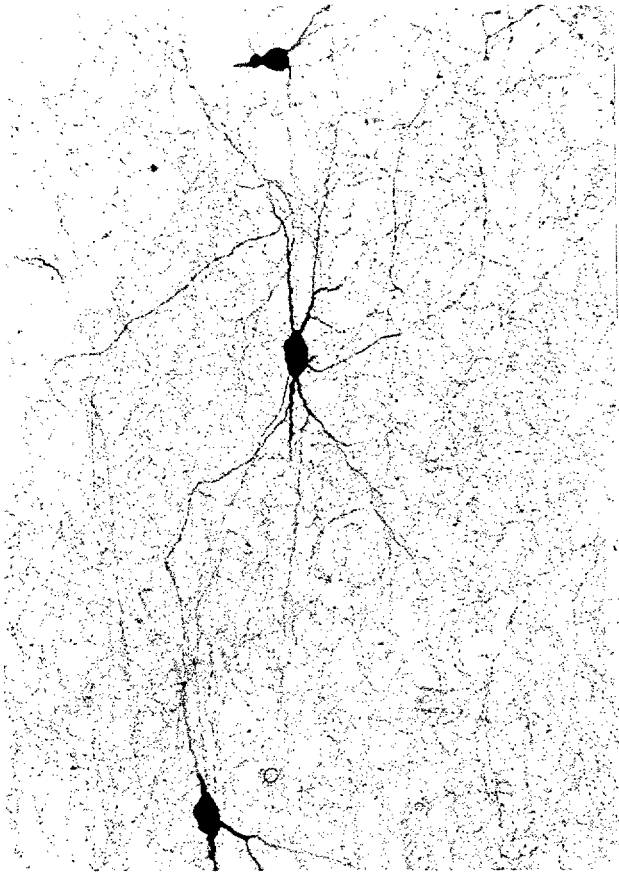
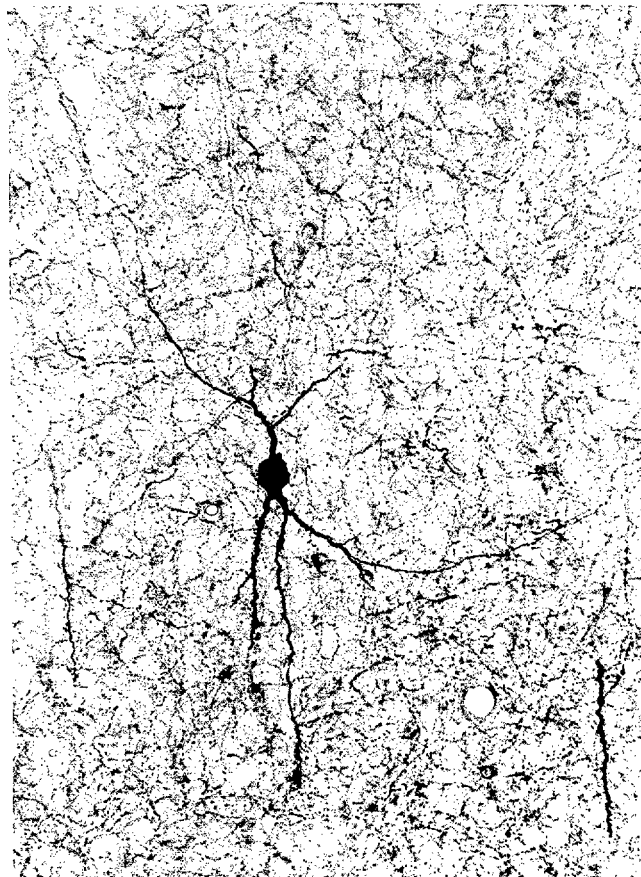


Fig. 45: Neurona bipeñachada. Cuerpo globoso. Orientación vertical. Los troncos dendríticos se bifurcan. Área Par₁. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehído.

Fig. 46: Neurona bipeñachada. Cuerpo globoso. Orientación vertical y el tronco basal bifurcado. Área Te₁. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehído.



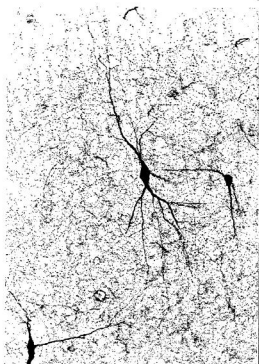
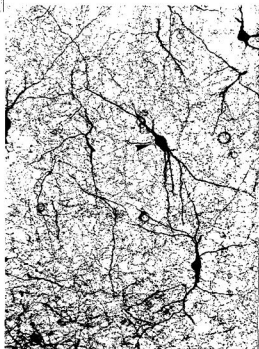


Fig. 47: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Orientación vertical. Tronco basal más desarrollado. Área Te. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 48: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Orientación vertical y tronco basal más ramificado. Área Te. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.



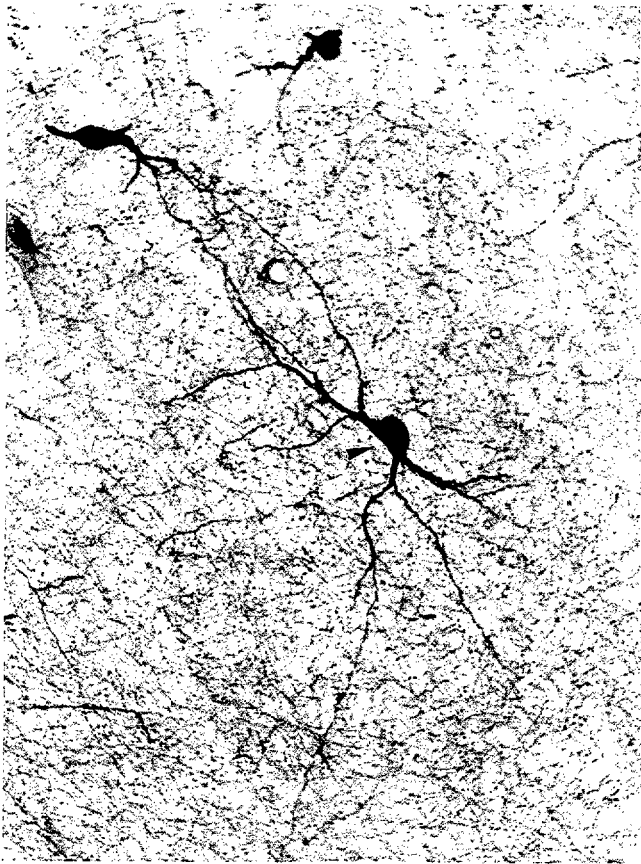


Fig. 49: Neurona bipenachada. Cuerpo globoso y algo irregular. Orientación vertical. Área Par₂. Capa V-VI. Animal adulto. Paraformaldehido.

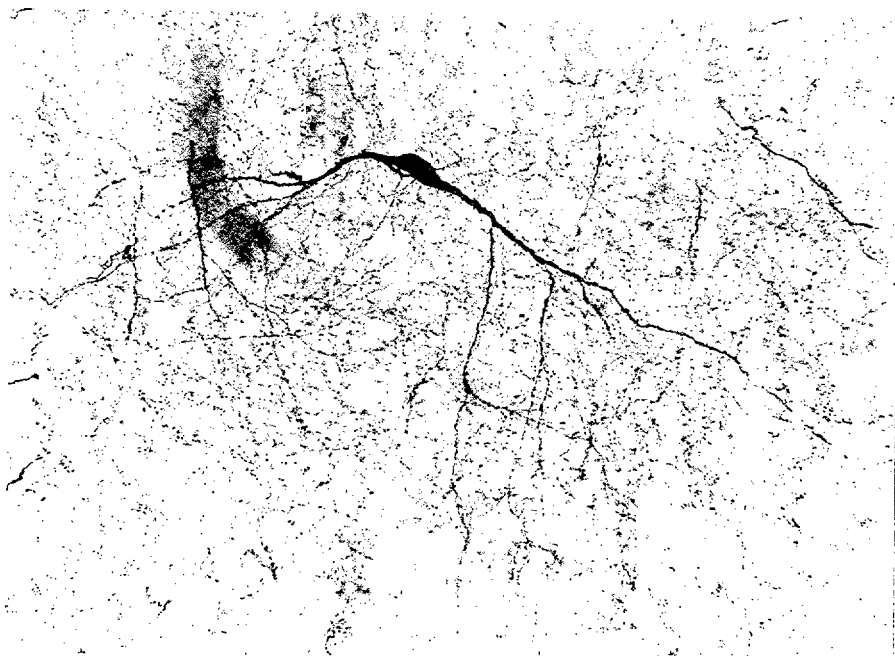


Fig. 50: Neurona bipenachada. Cuerpo algo irregular. Orientación horizontal. Área Oc₁. Capa III-IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

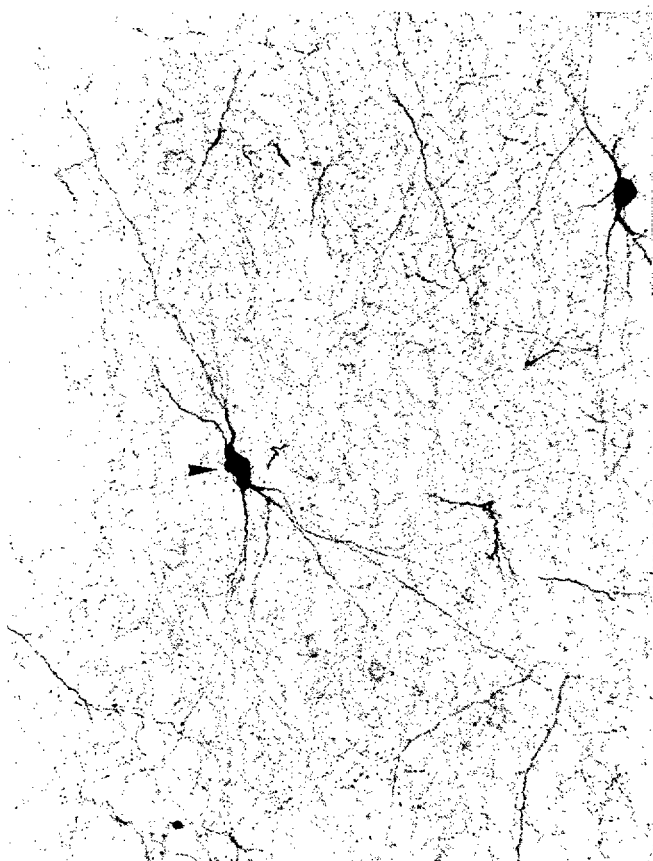
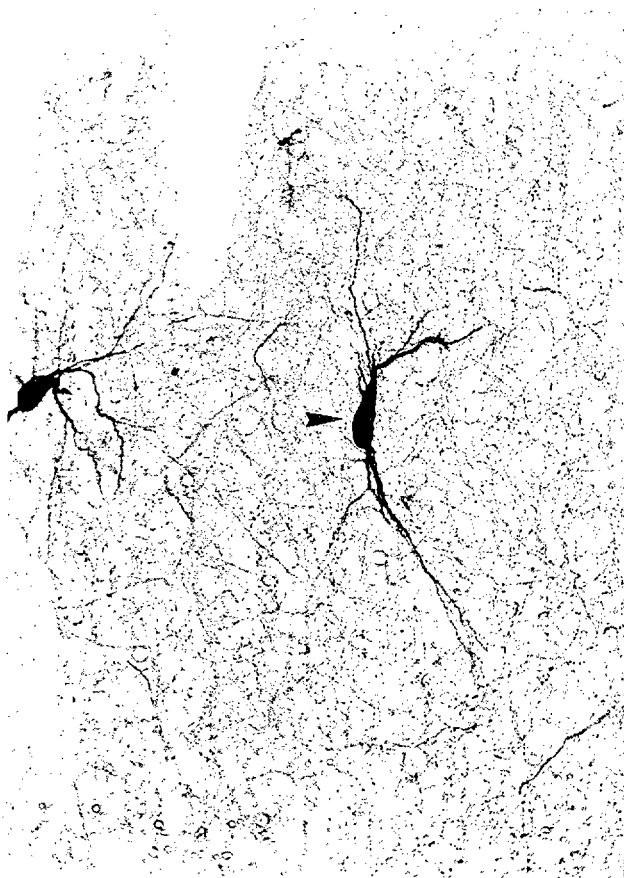


Fig. 51: Neurona bipenachada. Cuerpo irregular. Orientación vertical. Área Oc_{2M}. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 52: Neurona bipenachada. Cuerpo irregular. Orientación vertical. Área Oc_{2M}/Par. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.



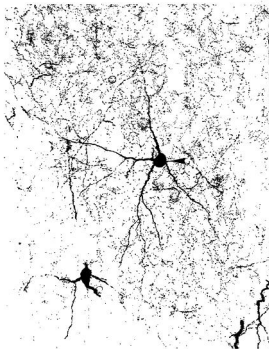


Fig. 53: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo globoso con ramificaciones en todas las direcciones del espacio. Area Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

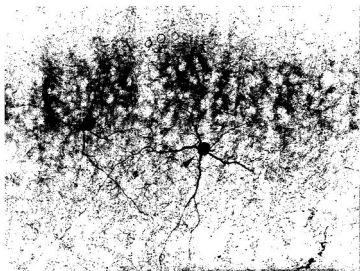


Fig. 54: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo globoso. Ramificaciones en todas las direcciones del espacio. Área Cg₃. Capa II-IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

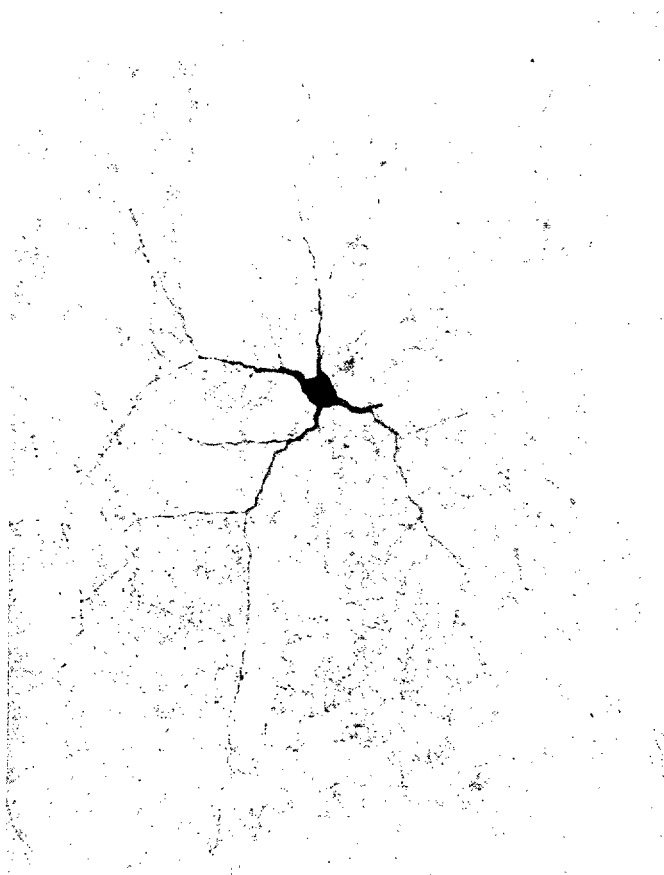


Fig. 55: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo poligonal con ramificaciones en todas las direcciones del espacio. Area Par₂. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

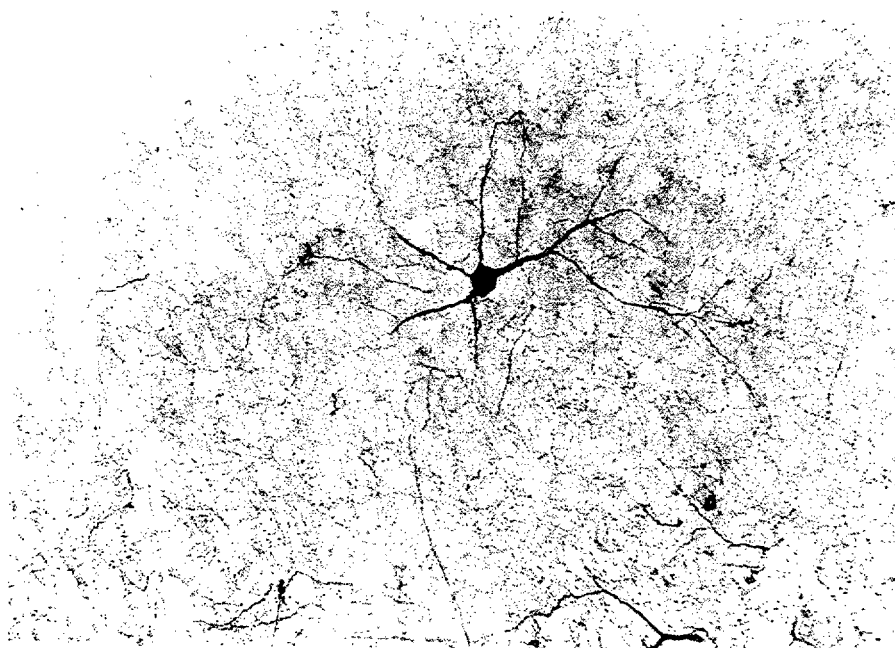


Fig. 56: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo poligonal. Ramificaciones en todas las direcciones del espacio. Área Te. Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

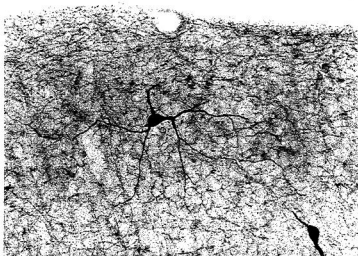


Fig. 57: Neurona multipolar. Cuerpo globoso y algo fusiforme. Orientación algo horizontal. Área Par. Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

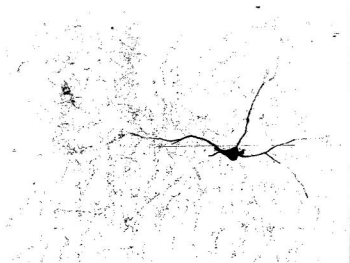


Fig. 58: Neurona multipolar. Cuerpo algo globoso y con una orientación más o menos horizontal. Área Oc., Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

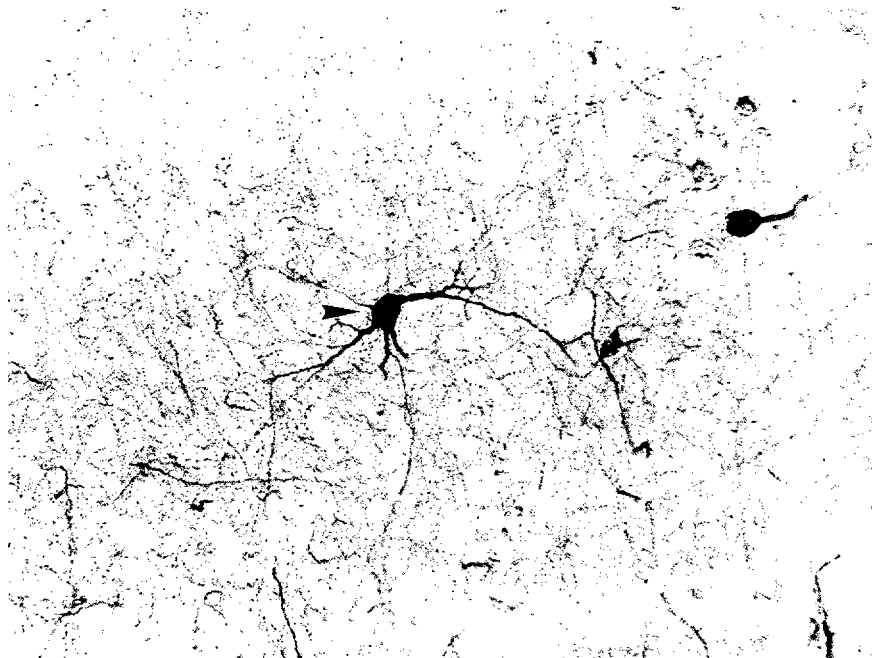


Fig. 59: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo globoso. Orientación algo horizontal. Área Oc., Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

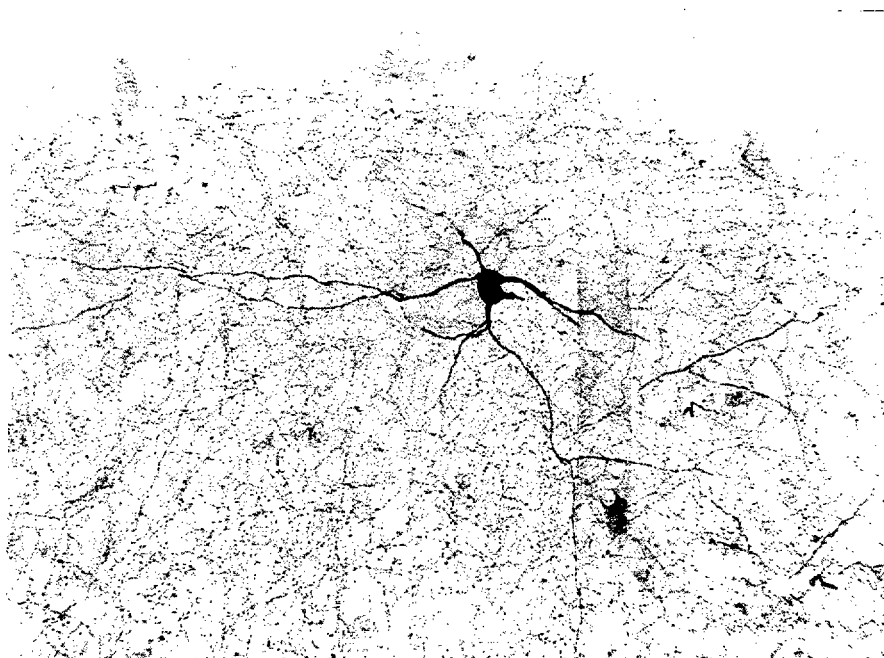


Fig. 60: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo algo globoso y con una orientación más o menos horizontal. Área Fr. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

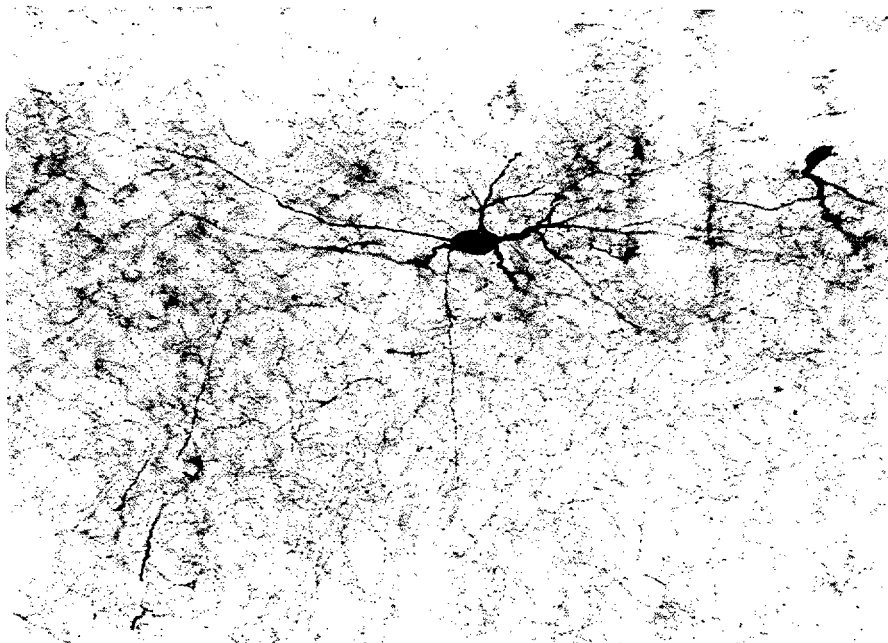


Fig. 61: Neurona multipolar. Cuerpo fusiforme y globoso. Orientación horizontal. Área Oc₂. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

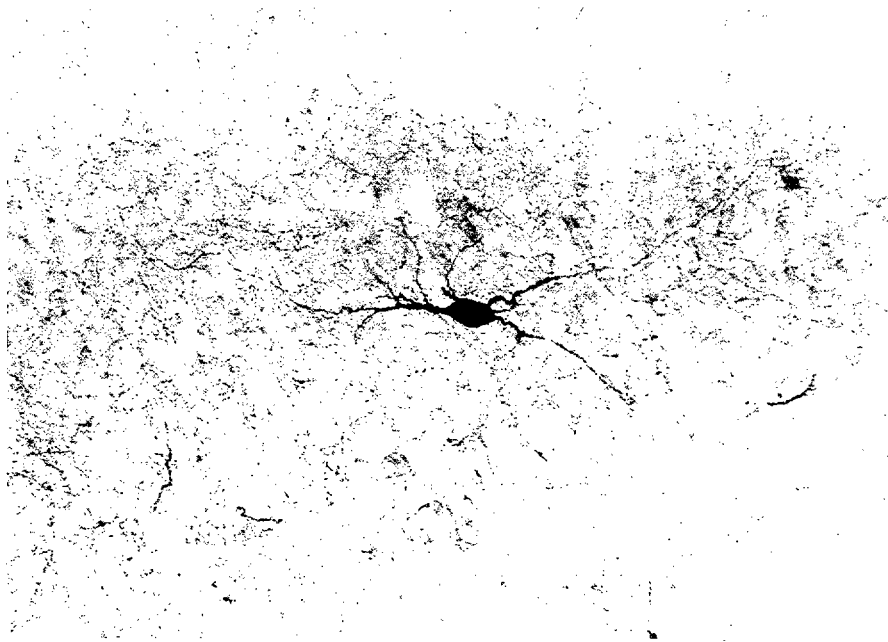


Fig. 62: Neurona multipolar. Cuerpo fusiforme y algo globoso. Orientación horizontal. Área Cg₁. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

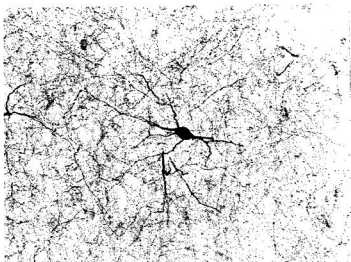


Fig. 63: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Orientación horizontal. Área Par. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

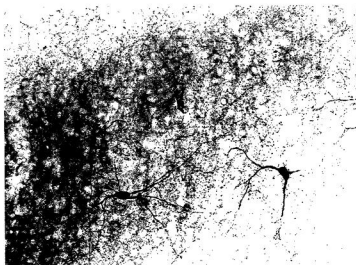


Fig. 64: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Orientación horizontal. Área límite AIP/Gu. Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

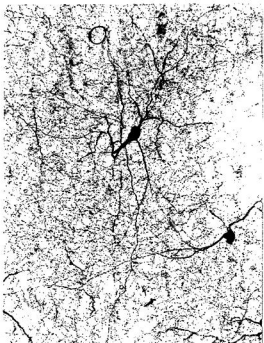
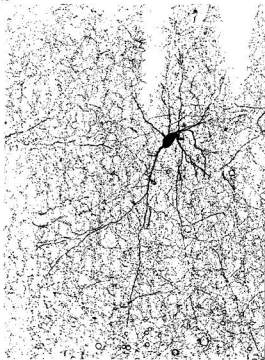


Fig. 65: Neurona multipolar.
Cuerpo fusiforme y algo globoso.
Orientación vertical. Área Te.
Capa IV-V. Animal adulto.
Paraformaldehido.

Fig. 66: Neurona multipolar.
Cuerpo fusiforme y algo globoso.
Orientación vertical. Área límite
Oc/Par. Capa II. Animal adulto.
Paraformaldehido.



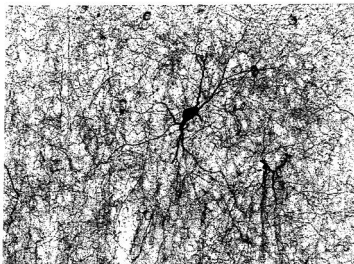


Fig. 67: Neurona multipolar. Cuerpo algo globoso e irregular. Orientación vertical. Área Par_1 , Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

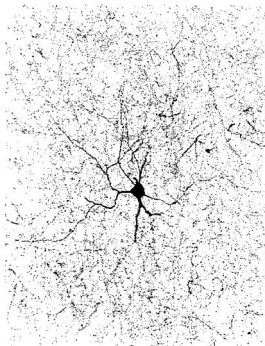


Fig. 68: Neurona multipolar. Cuerpo algo globoso. Orientación vertical. Área Fr_1 , Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

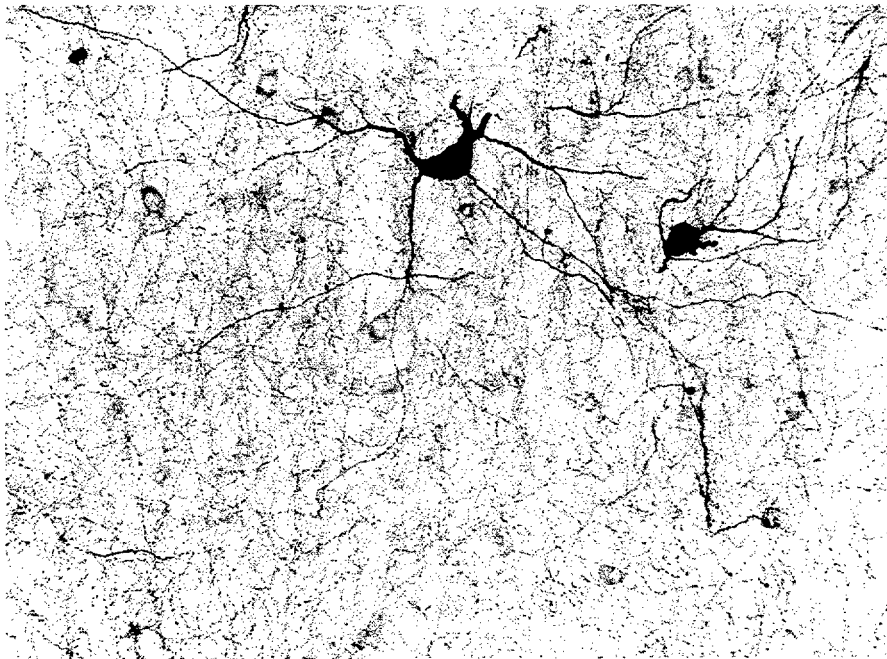


Fig. 69: Neurona multipolar. Cuerpo irregular en media luna. Área Oc₁. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

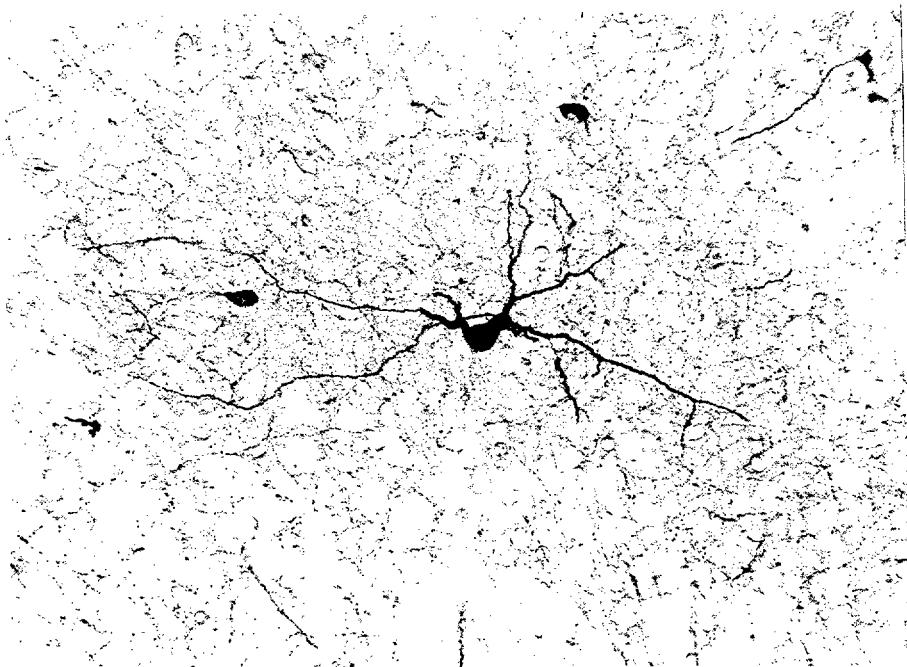


Fig. 70: Neurona multipolar. Cuerpo irregular con aspecto en media luna. Área RSA. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

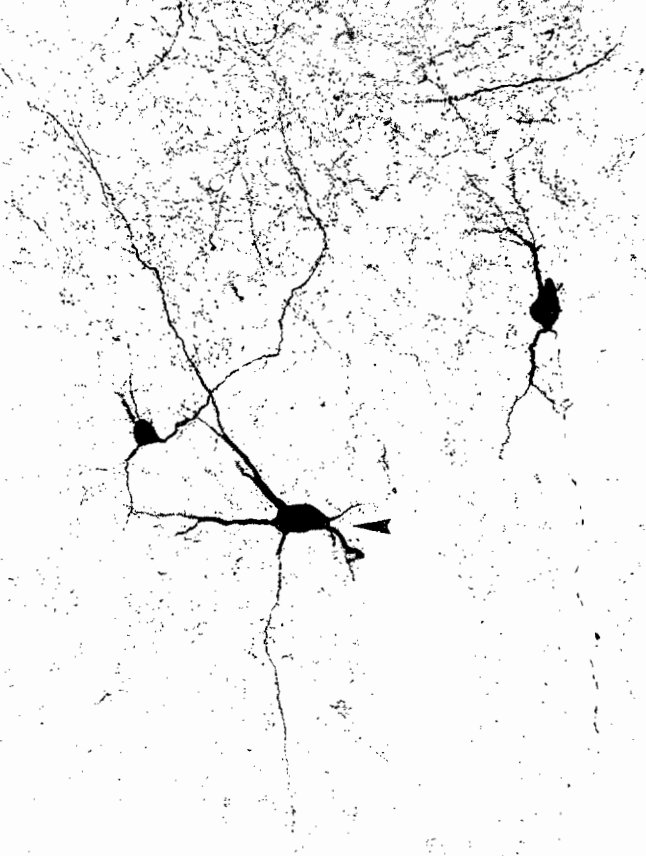
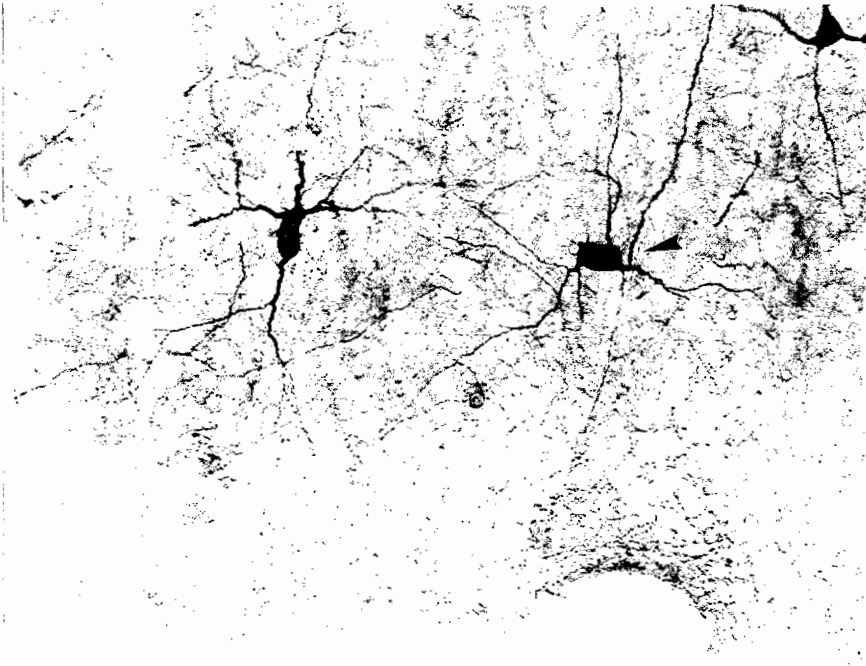


Fig. 72: Neurona multipolar. Cuerpo irregular con ramificaciones en todas las direcciones. Area Oc_2 . Capa IV-V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 71: Neurona multipolar. Cuerpo irregular con ramificaciones en todas las direcciones. Area Oc_2^{M} . Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.



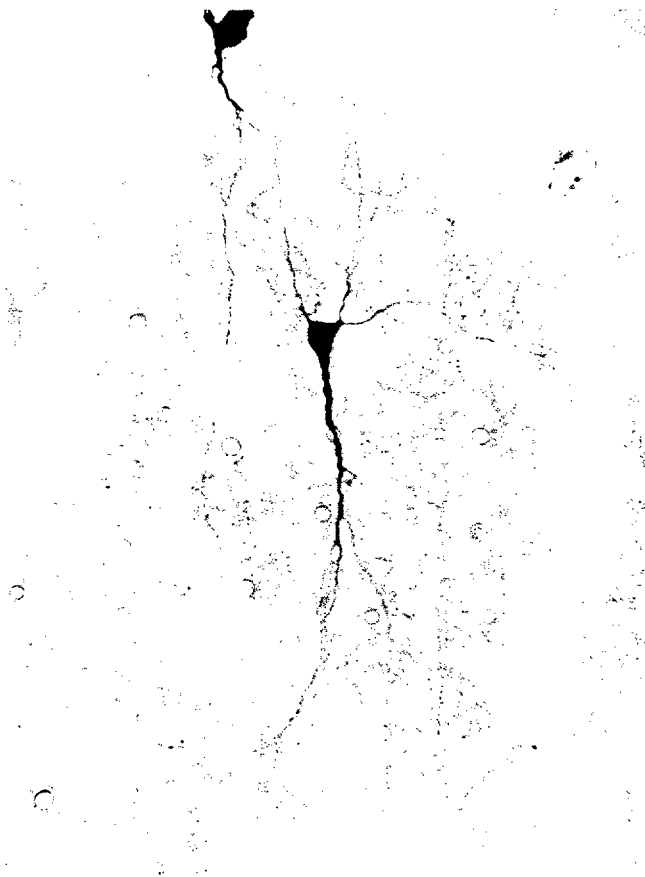
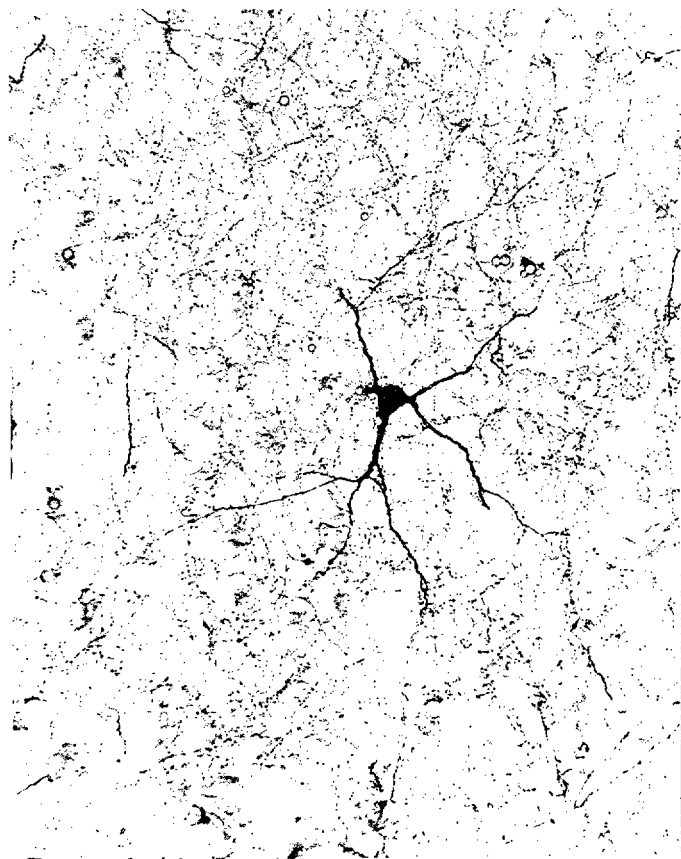


Fig. 73: Neurona multipolar en Y. Cuerpo triangular. Dendrita basal más desarrollada. Área Par. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 74: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular globoso. Los 3 árboles dendríticos presentan un desarrollo similar. Área Te. Capa IV-V. Animal adulto. Paraformaldehido.



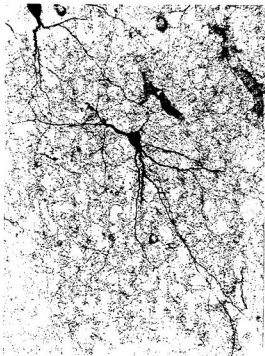
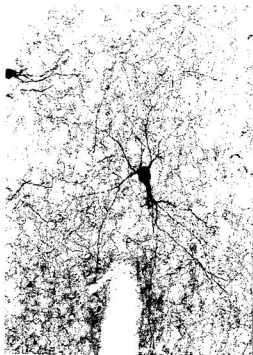


Fig. 75: Neurona multipolar en Y. Cuerpo triangular algo cuadrangular. Dendrita basal más desarrollada. Área Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 76: Neurona multipolar en Y. Cuerpo triangular algo cuadrangular. Dendrita basal más desarrollada. Área Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.



tipos neuronales

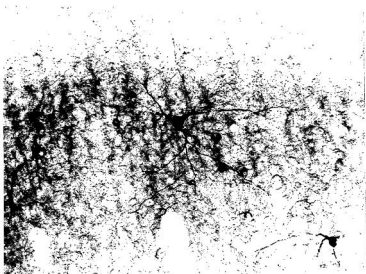


Fig. 77: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular pequeño. Sin predominio de un tronco dendrítico. Área Te_2 . Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

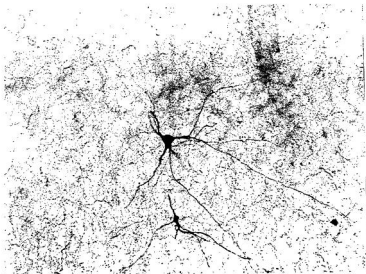


Fig. 78: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular pequeño. Sin predominio de un tronco dendrítico. Área Oc_1 . Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

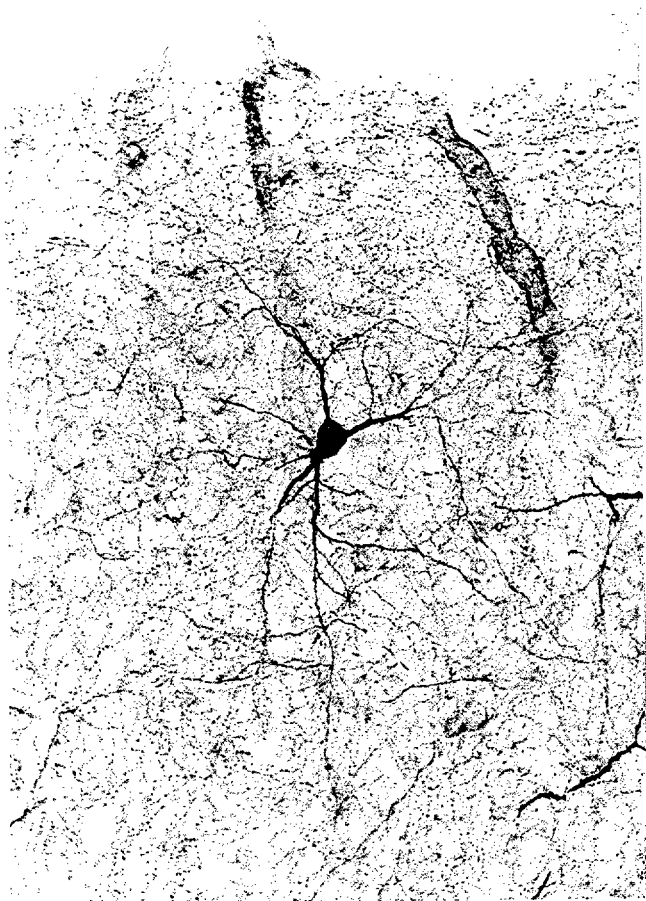
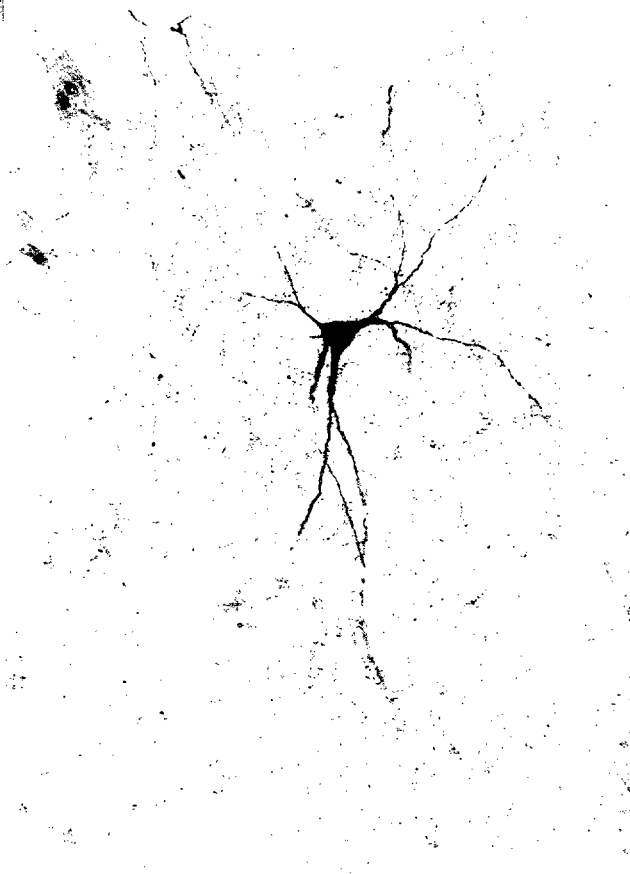


Fig. 79: Neurona multipolar en Y. Cuerpo triangular algo cuadrangular. Orientación oblicua con respecto a la piamadre. Área Te. Capa II-III. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 80: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular. Una dendrita apical más desarrollada. Área RSA. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.



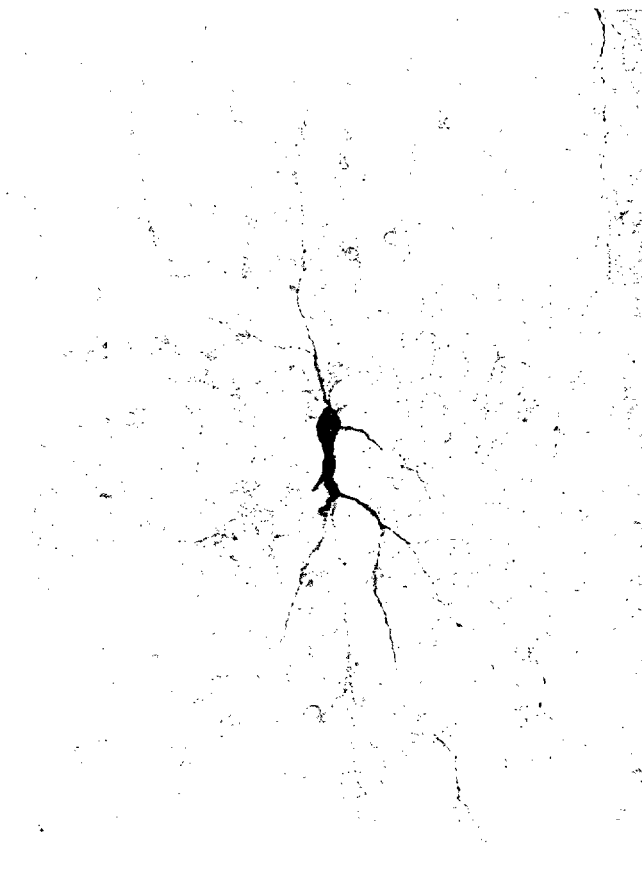
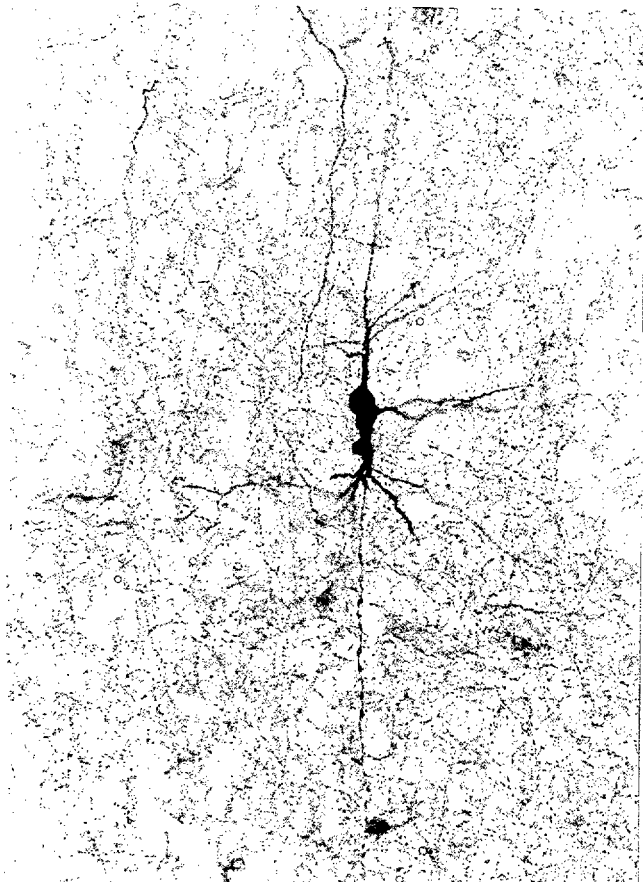


Fig. 81: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Orientación vertical. Aspecto bipenachado. Área Par1. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 82: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Orientación vertical. Aspecto multipolar. Área HL. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.



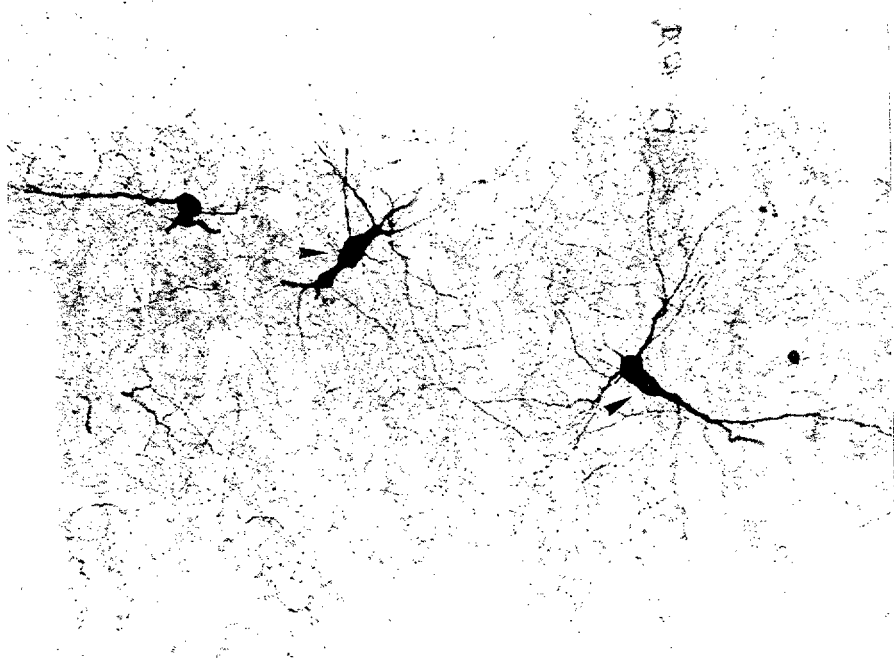


Fig. 83: Neuronas atípicas. Cuerpos alargados e irregulares. Orientación horizontal. Aspectos bipenachado y multipolar. Área Gu. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

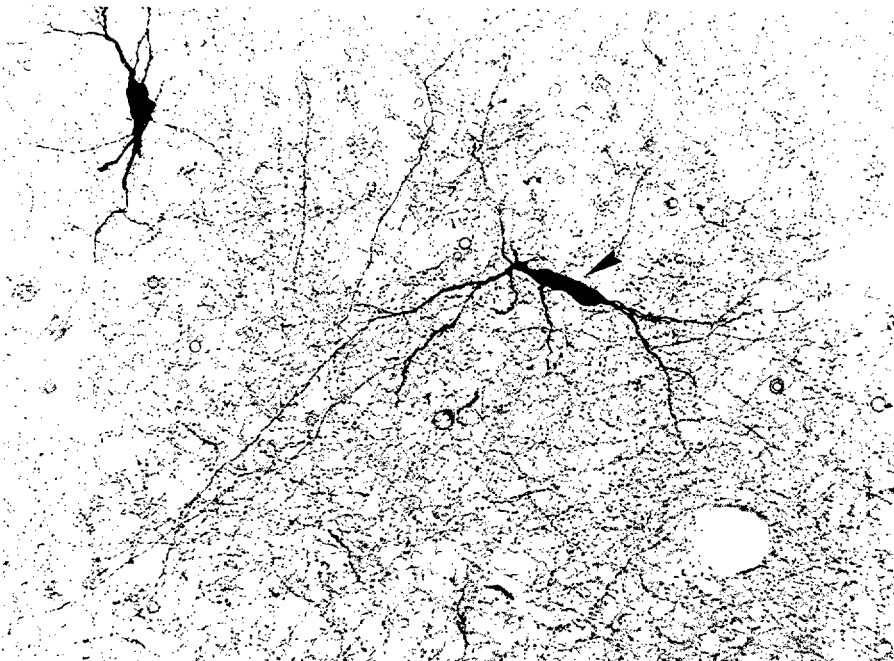


Fig. 84: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular de orientación horizontal y aspecto multipolar. Área Te. Capa V-VI. Animal adulto. Paraformaldehido.

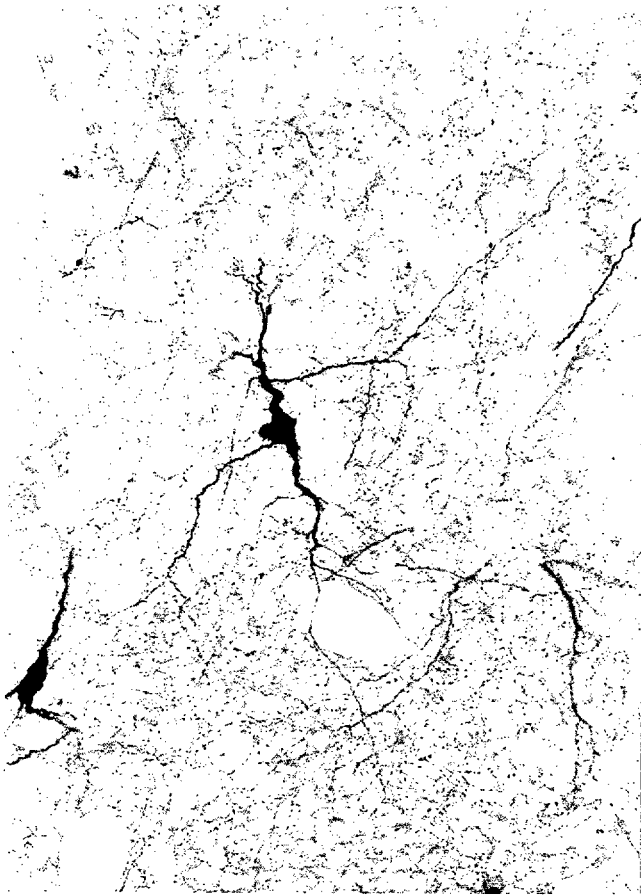
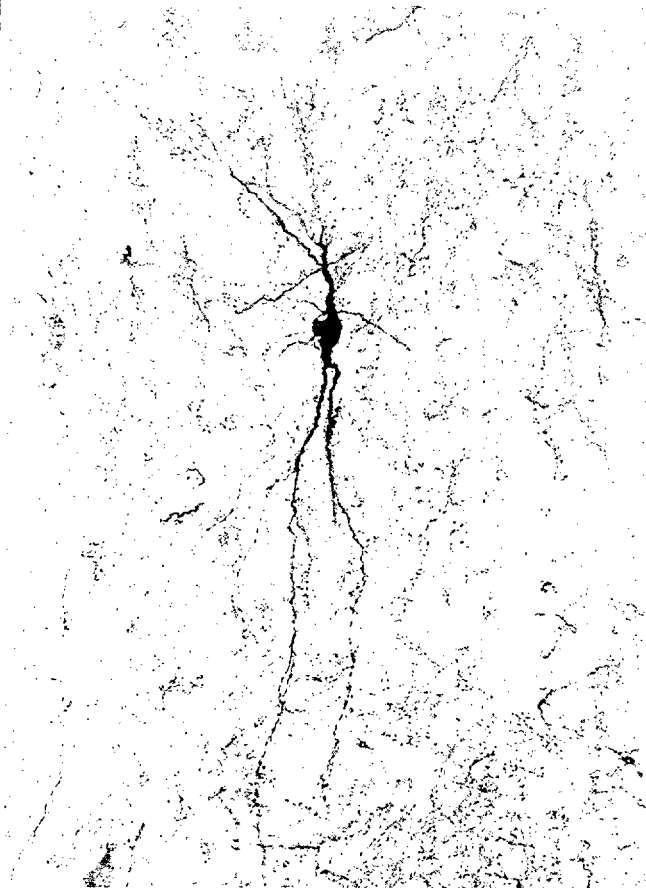


Fig. 85: Neurona atípica. Cuerpo fuertemente irregular del que sobresalen prolongaciones somáticas. Vertical. Área Te₁. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 86: Neurona atípica. Cuerpo irregular con prolongaciones que sobresalen del mismo. Área Te₁. Capa IV-V. Animal adulto. Paraformaldehido.



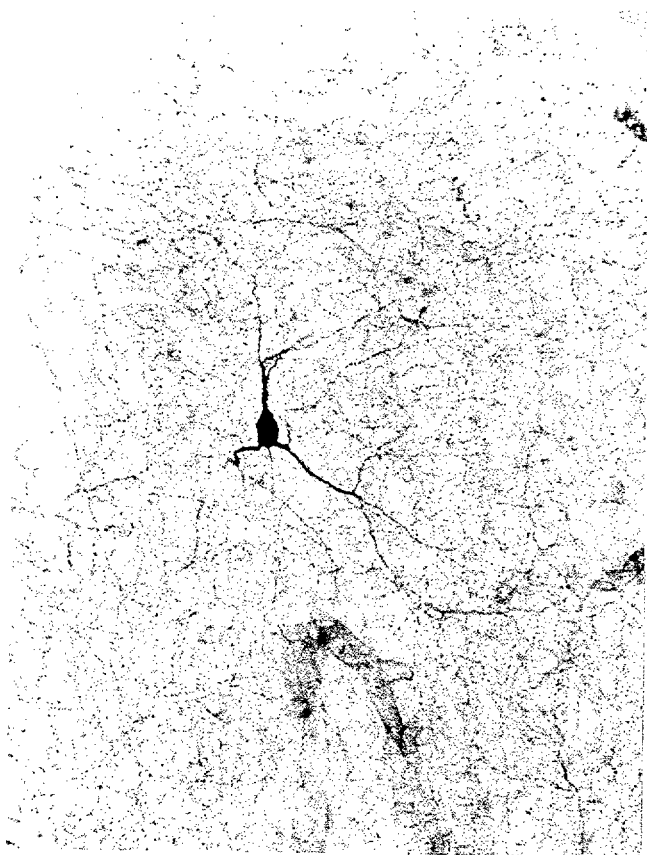
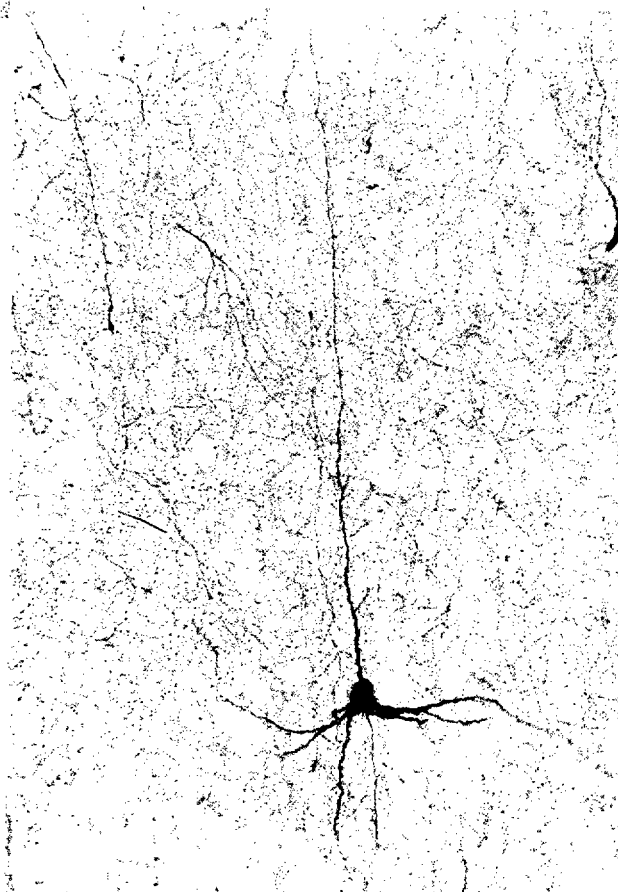


Fig. 87: Neurona piramidal de pequeño tamaño. Área Te. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 88: Neurona piramidal de mediano tamaño. Área límite Te/Par. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.



Animales viejos

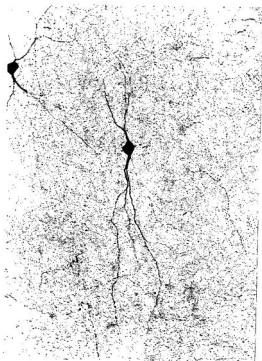


Fig. 89: Neurona bipolar. Cuerpo globoso. Amplia ramificación dendrítica. Área Par. Capa III. Animal viejo. Paraformaldehido.

Fig. 90: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme y algo irregular. Área Par. Capa IV. Animal viejo. Paraformaldehido.



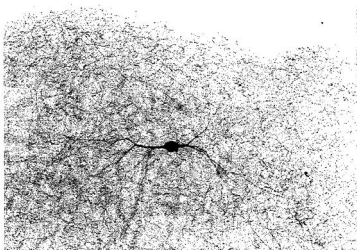


Fig. 91: Neurona bipolar. Cuerpo globoso. Orientación horizontal. Área Par. Capa I-II. Animal viejo. Paraformaldehido.

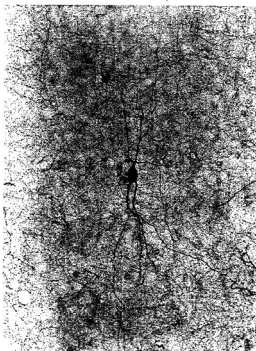


Fig. 92: Neurona bipinachada. Cuerpo globoso y algo fusiforme. Área Fr. Capa IV. Animal viejo. Paraformaldehido.

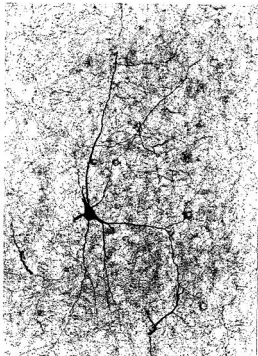
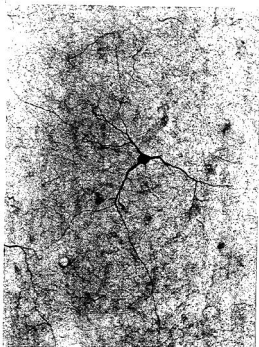


Fig. 93: Neurona multipolar.
Cuerpo globoso. orientación
vertical. Área Par. Capa IV-V.
Animal viejo. Paraformaldehido.

Fig. 94: Neurona multipolar.
Cuerpo globoso. Aspecto
estrellado. Área Fr. Capa V.
Animal viejo. Paraformaldehido.



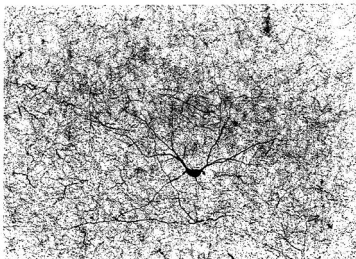


Fig. 95: Neurona multipolar. Cuerpo con aspecto de media luna. Área Fr. Capa II/III. Animal viejo. Paraformaldehido.

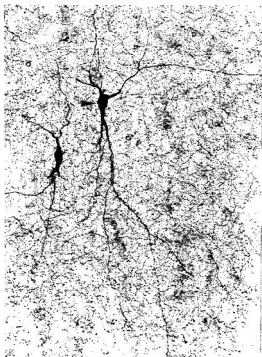


Fig. 96: Neurona multipolar en T. Cuerpo cuadrangular. Dendrita basal más desarrollada. Área Gu. Capa V. Animal viejo. Paraformaldehido.

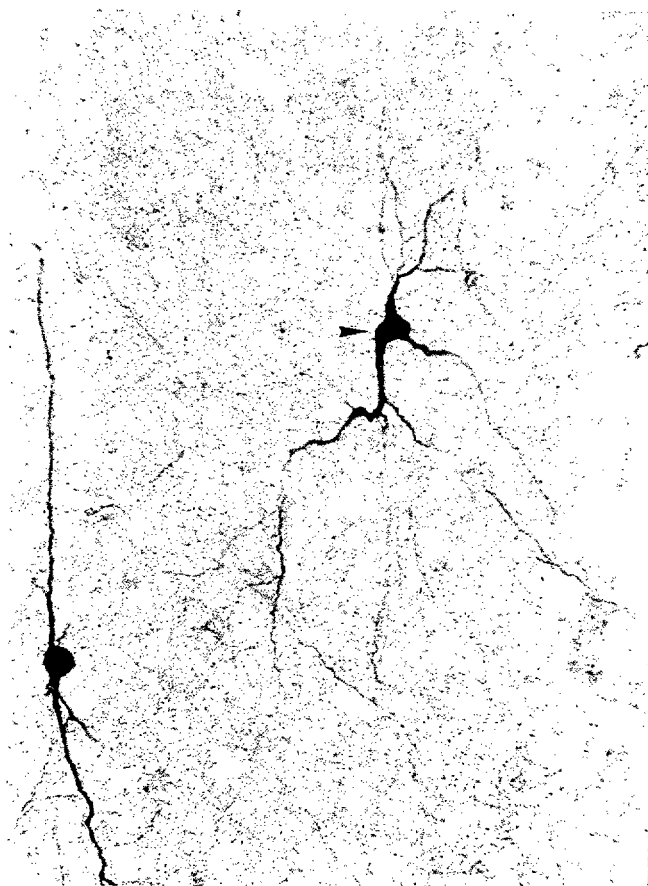


Fig. 97: Neurona atípica. Cuerpo alargado. Área Par. Capa V. Animal viejo. Paraformaldehido.

Animales jóvenes

Fig. 98: Neurona bipolar. Cuerpo globose. Escasas ramificaciones. Área Fr/Cg. Capa II. Además se observa una neurona multipolar de cuerpo globose. Animal joven. Glutaraldehído.

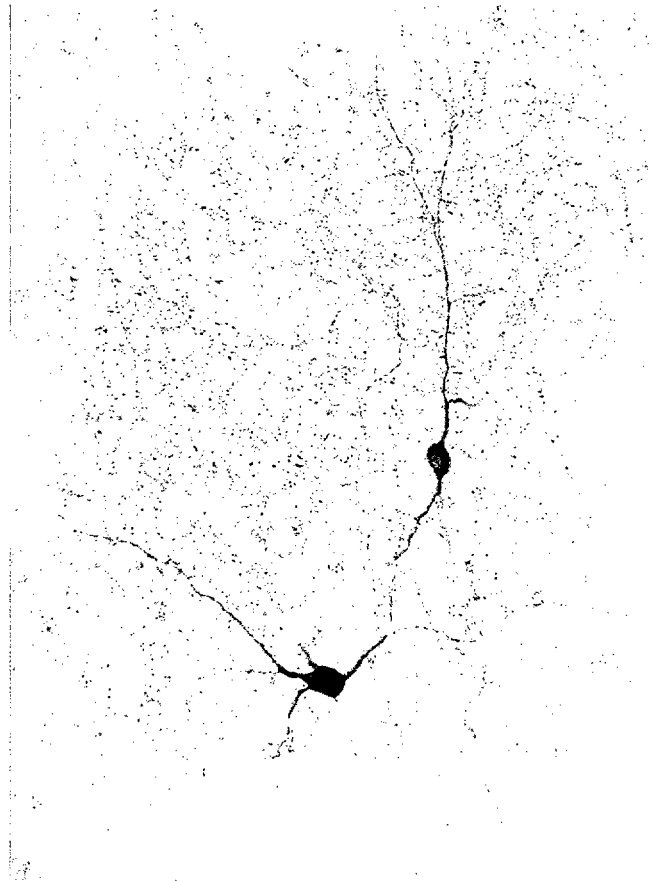


Fig. 99: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Escasas ramificaciones. Neurona multipolar de cuerpo globose. Área Cg. Capa II. Animal joven. Glutaraldehído.



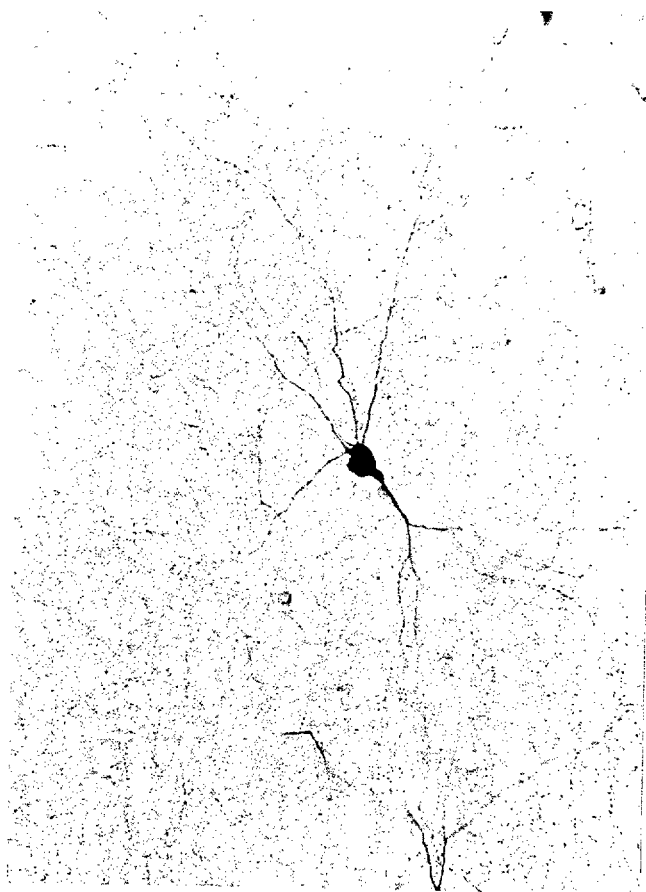


Fig. 100: Neurona bipenachada. Cuerpo globoso. Zona apical con tres troncos dendríticos. Área Par. Capa III. Animal joven. Glutaraldehido.

Fig. 101: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Amplia ramificación dendrítica. Área Fr. Capa V. Animal joven. Glutaraldehido.



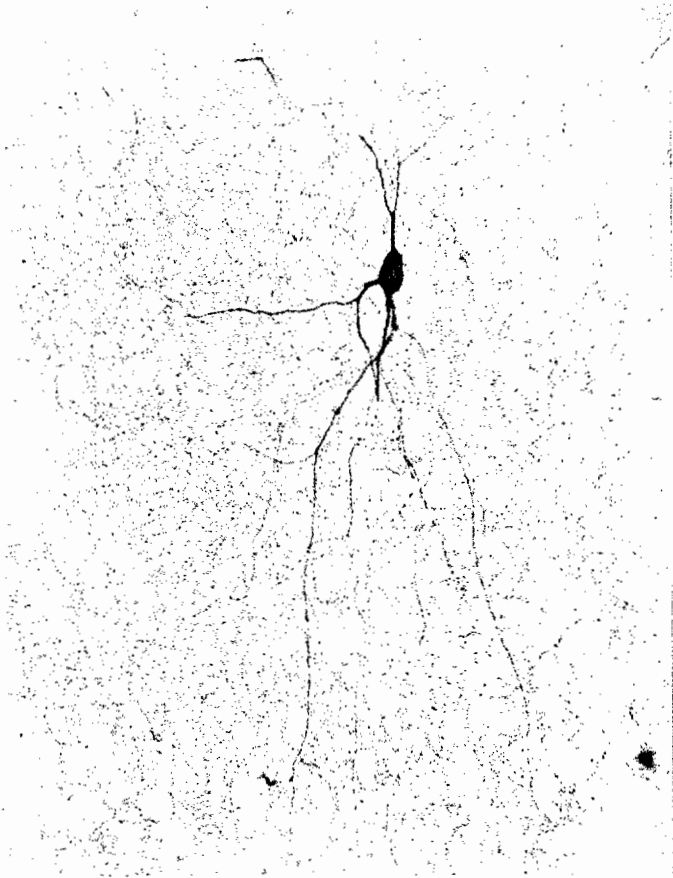


Fig. 102: Neurona multipolar.
Cuerpo globoso. orientación
vertical. Área Par. Capa IV.
Animal joven. Glutaraldehido.

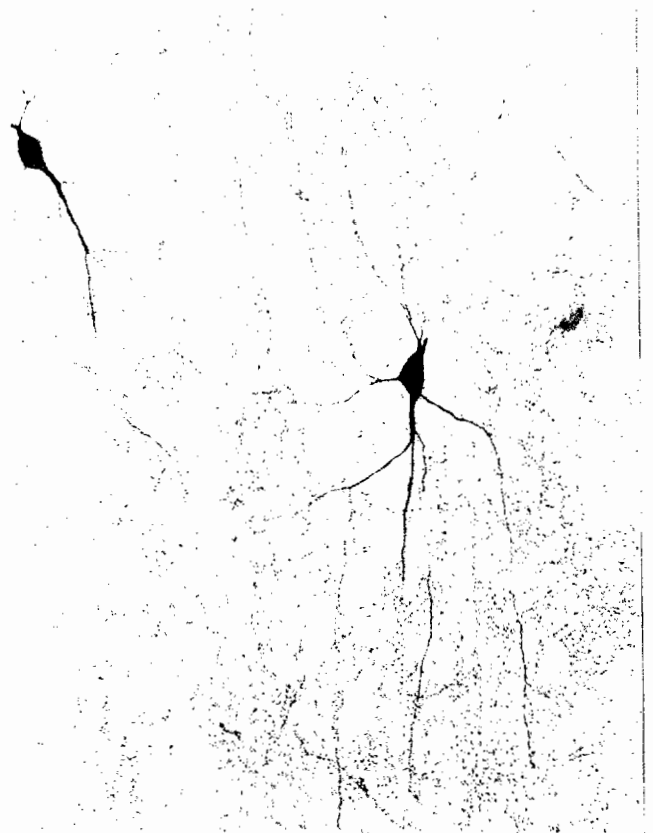


Fig. 103: Neurona multipolar.
Cuerpo globoso. Área Cg/Fr.
Capa II. Animal joven.
Glutaraldehido.

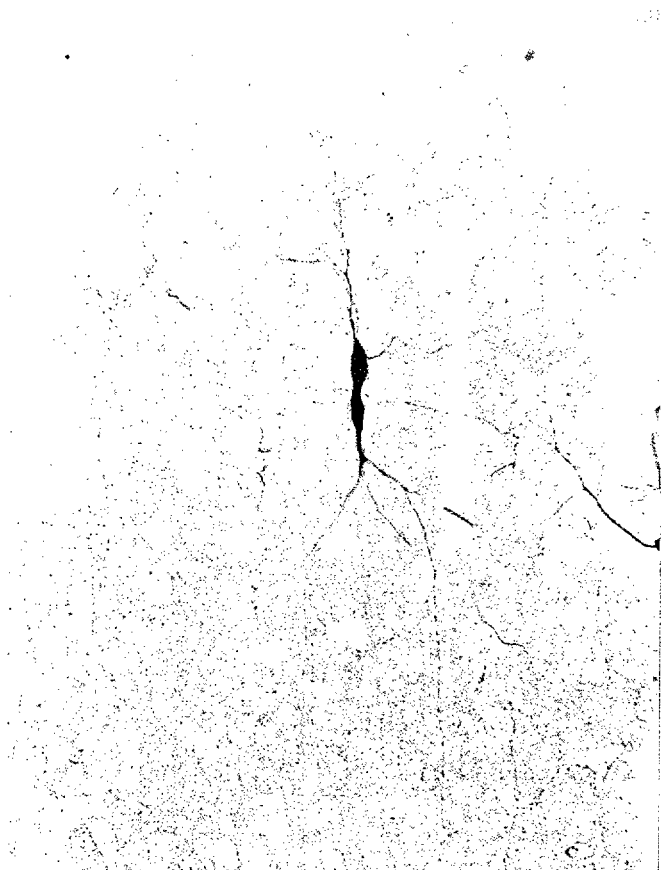


Fig. 104: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Escaso árbol dendrítico. Área HL/Par. Capa III. Animal joven. Glutaraldehido.

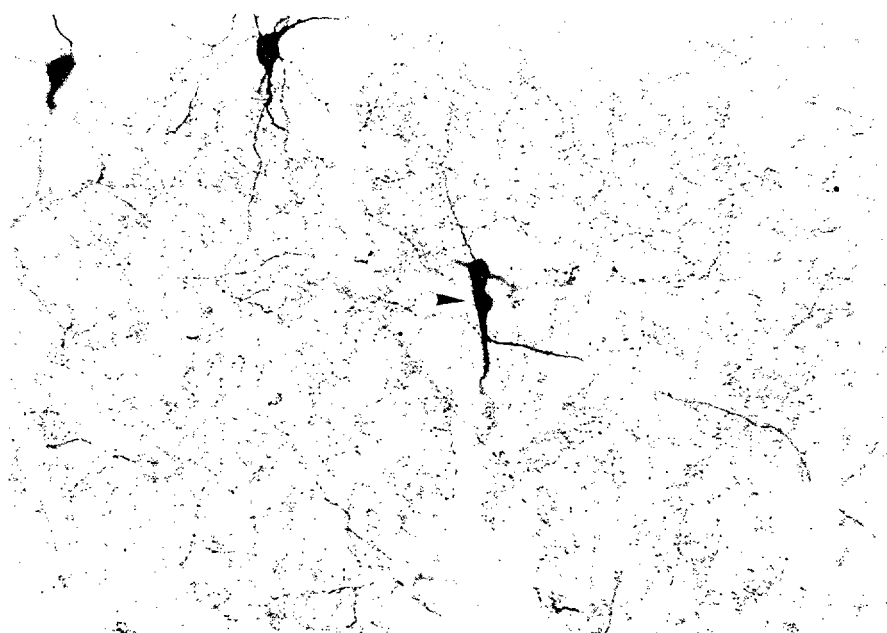


Fig. 105: Neurona atípica. Cuerpo alargado y con abultamientos. Escaso árbol dendrítico. Área Par. Capa V. Animal joven. Glutaraldehido.

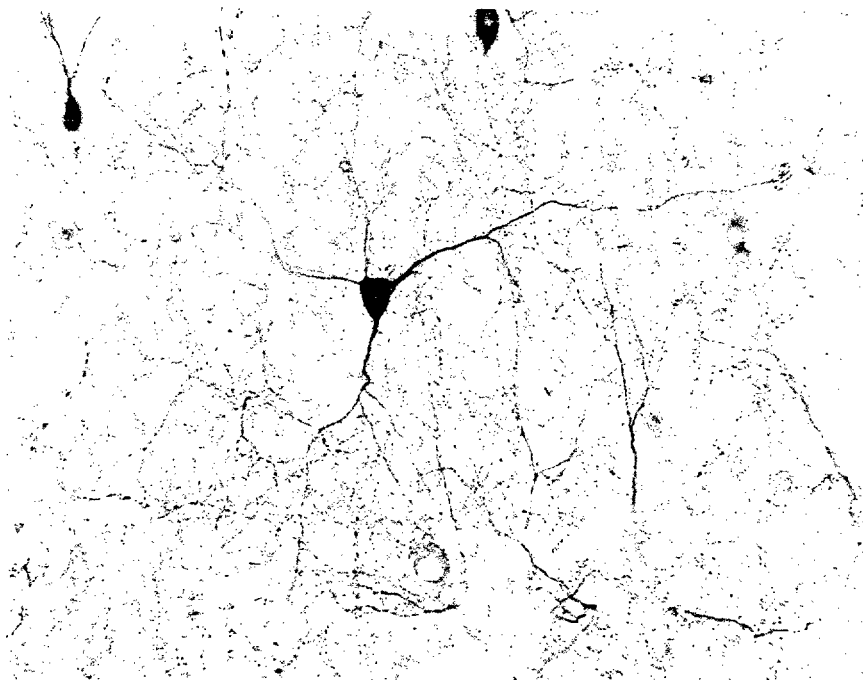


Fig. 106: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular sin troncos dendríticos predominantes. Área Fr/Par. Capa II. Animal joven. Glutaraldehido.

Animales adultos

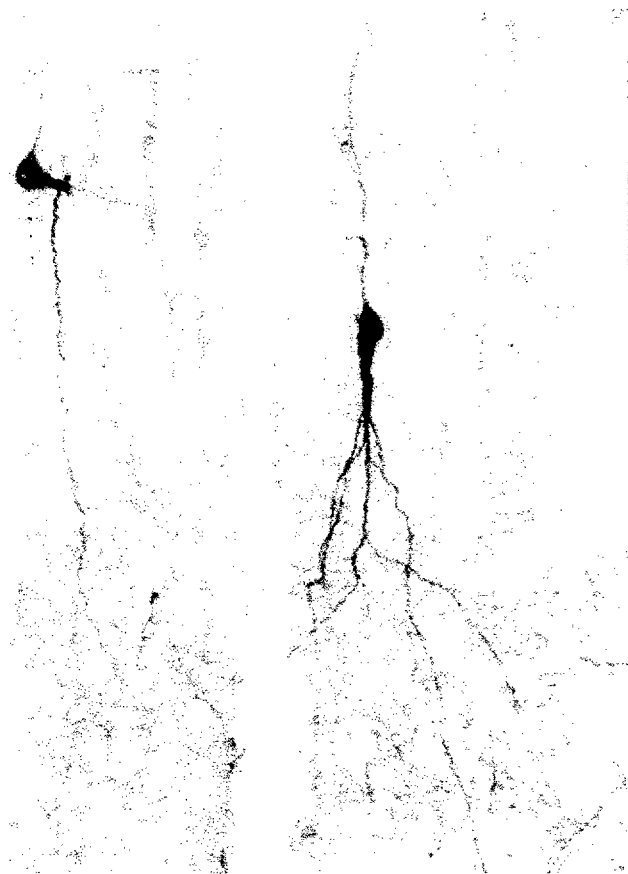


Fig. 107: Neurona bipolar. Cuerpo alargado y fusiforme. Amplia ramificación del tronco basal. Área Oc. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

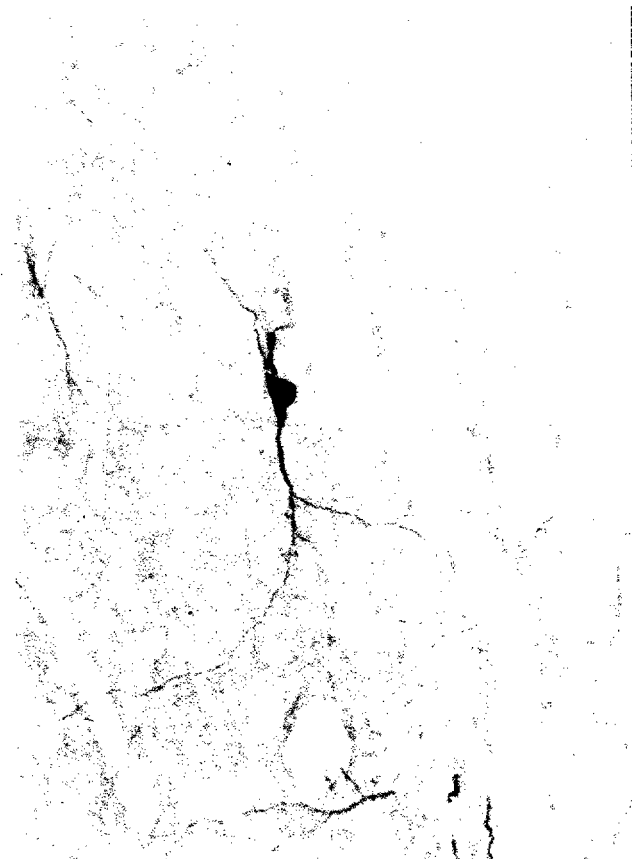


Fig. 108: Neurona bipolar. Cuerpo globoso algo excéntrico. Relacionada con un vaso. Área Par. Capa IV. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

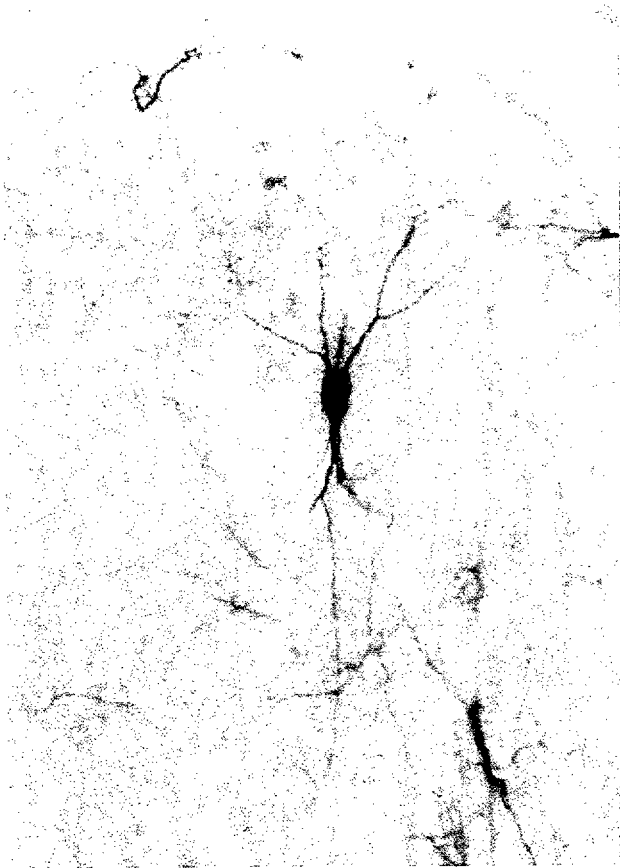
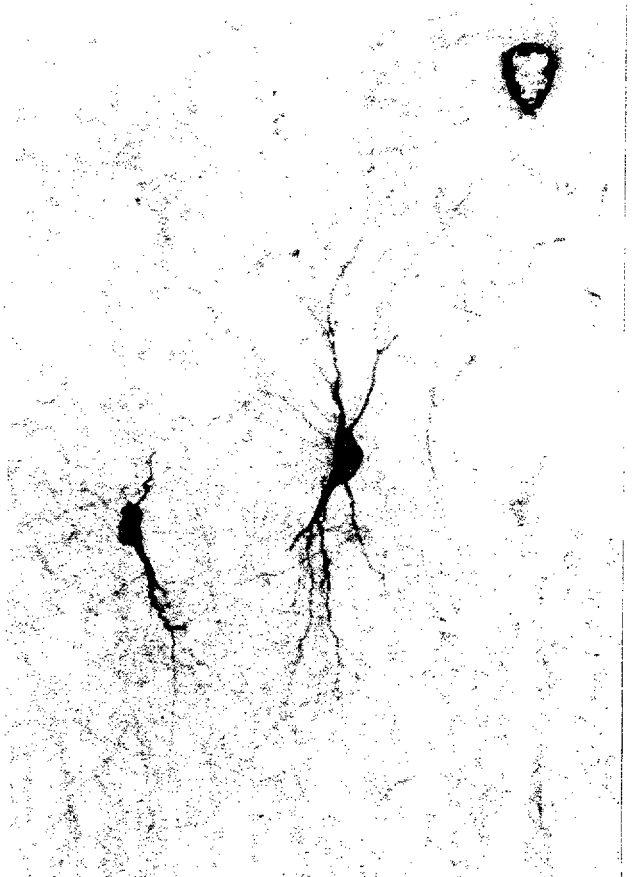


Fig. 109: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme y algo globoso. Área HL/Par. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

Fig. 110: Neurona bipenachada. Cuerpo globoso. Doble tronco dendrítico en los dos polos. Área Par. Capa II. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.



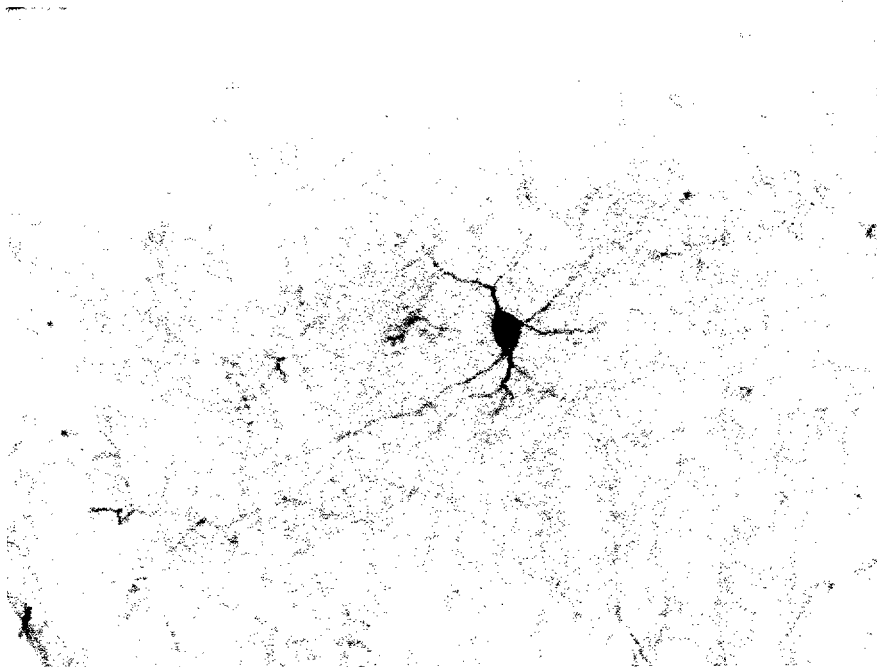


Fig. 111: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Área Fr/Par. Capa II. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

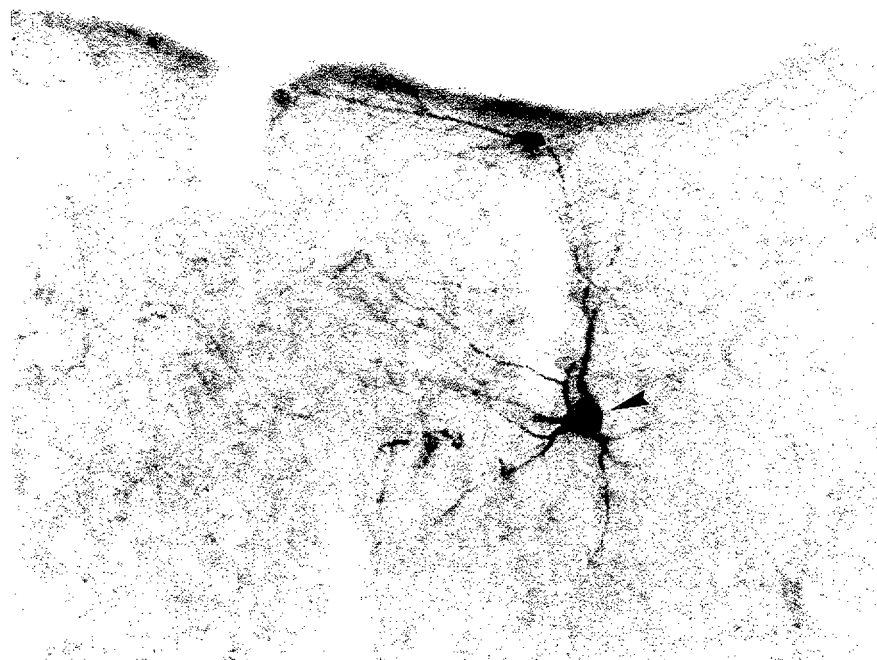


Fig. 112: Neurona multipolar. Cuerpo poligonal. Área Par. Capa I-II. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

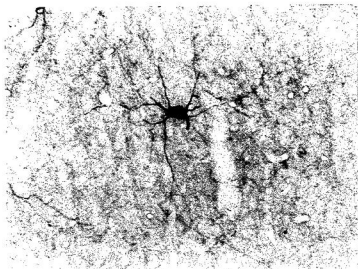


Fig. 113: Neurona multipolar. Cuerpo con aspecto parecido a una media luna. Área Par. Capa III-IV. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

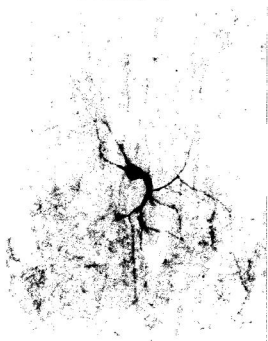


Fig. 114: Neurona atípica. Cuerpo irregular y aspecto multipolar. Área Oc₂/Par. Capa IV. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

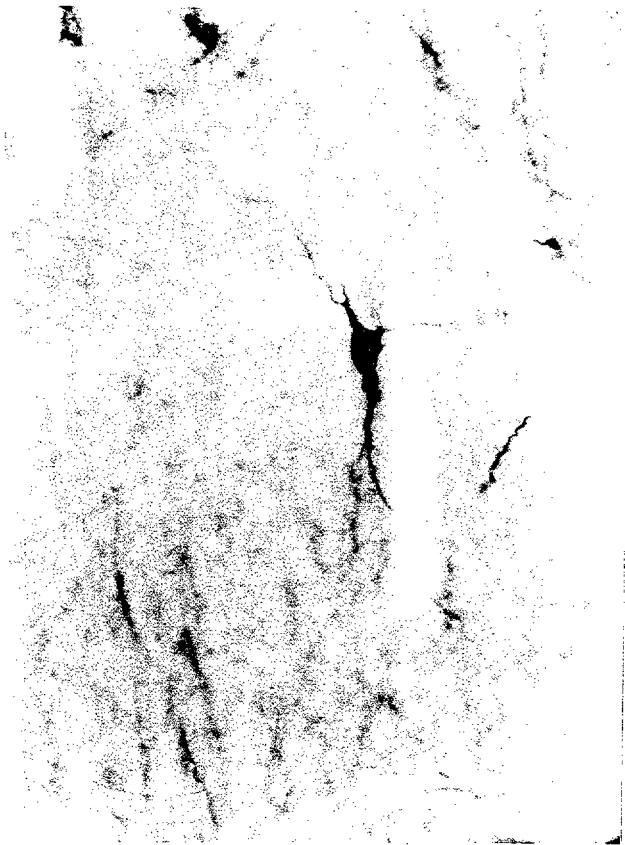


Fig. 115: Neurona multipolar en Y. Cuerpo triangular globoso. Tronco dendrítico basal más desarrollado. Área Par. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

Fig. 116: Neurona multipolar con cuerpo triangular y algo globoso. Troncos dendríticos apicales ampliamente ramificados. Área Fr. Capa II. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.



Animales adultos

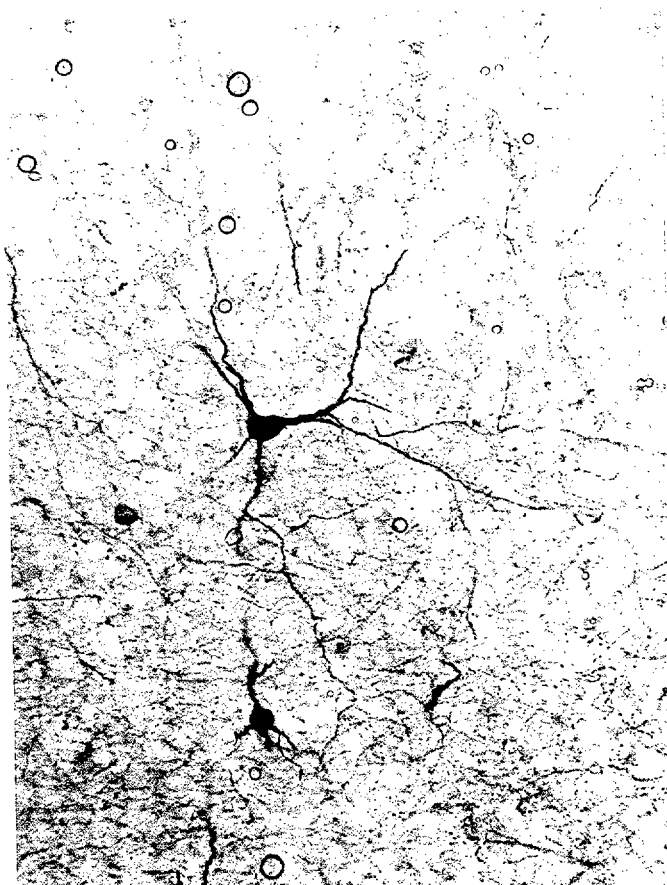


Fig. 117: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Área Te. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

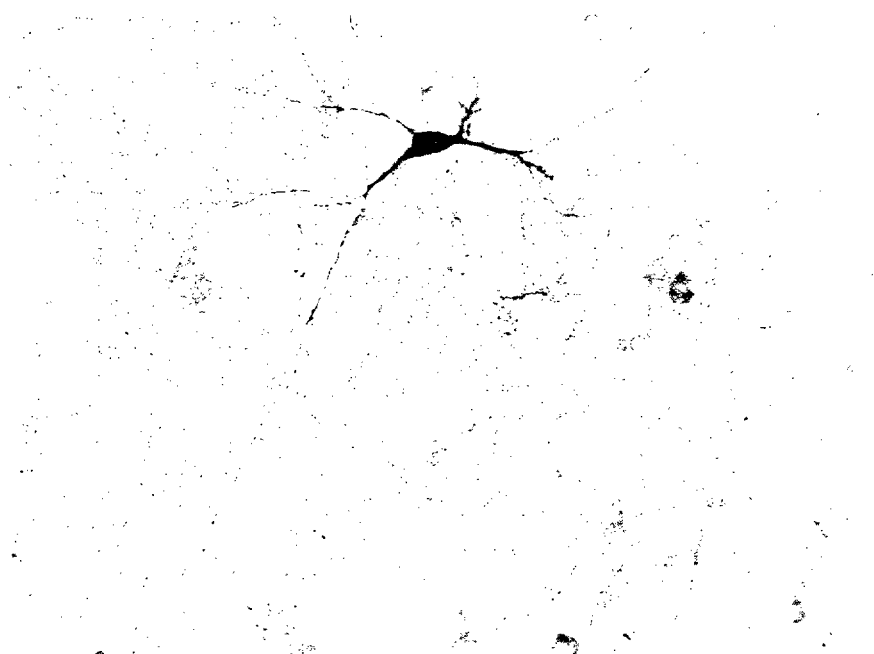


Fig. 118: Neurona multipolar. Cuerpo fusiforme y algo globoso. Orientación horizontal. Área Par₂. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.



Fig. 119: Neurona multipolar estrellada. Cuerpo poligonal. Área Te. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehido.

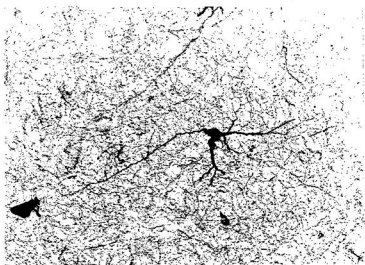


Fig. 120: Neurona multipolar en T. Cuerpo irregular. Área Te/Par. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 121: Neurona bípennachada. Orientación vertical. Área Te. Capa VI_a. Animal adulto. Parafomaldehído.

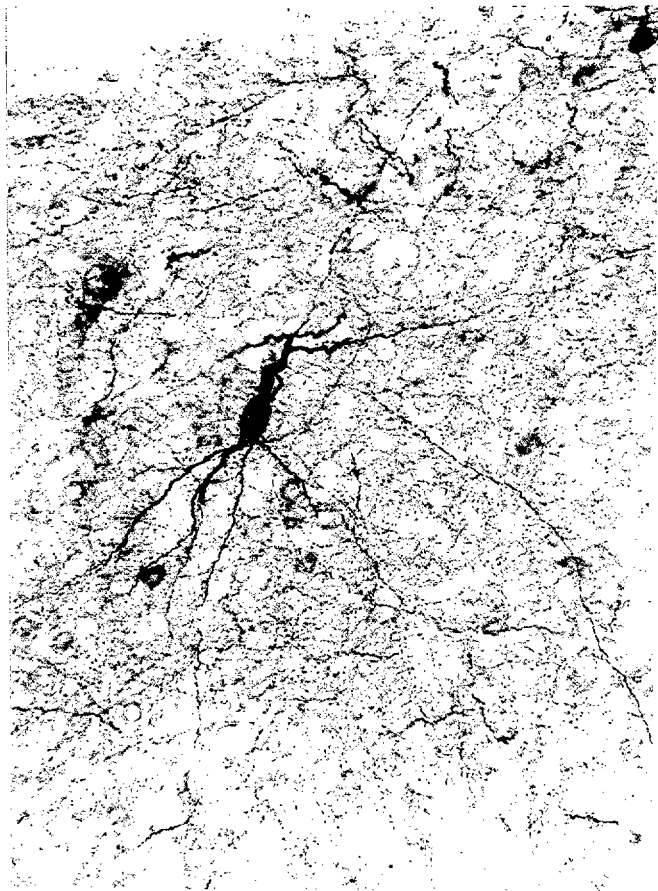


Fig. 122: Neurona bípennachada. Cuerpo algo irregular. Área Te. Capa VI_a. Animal adulto. Parafomaldehído.

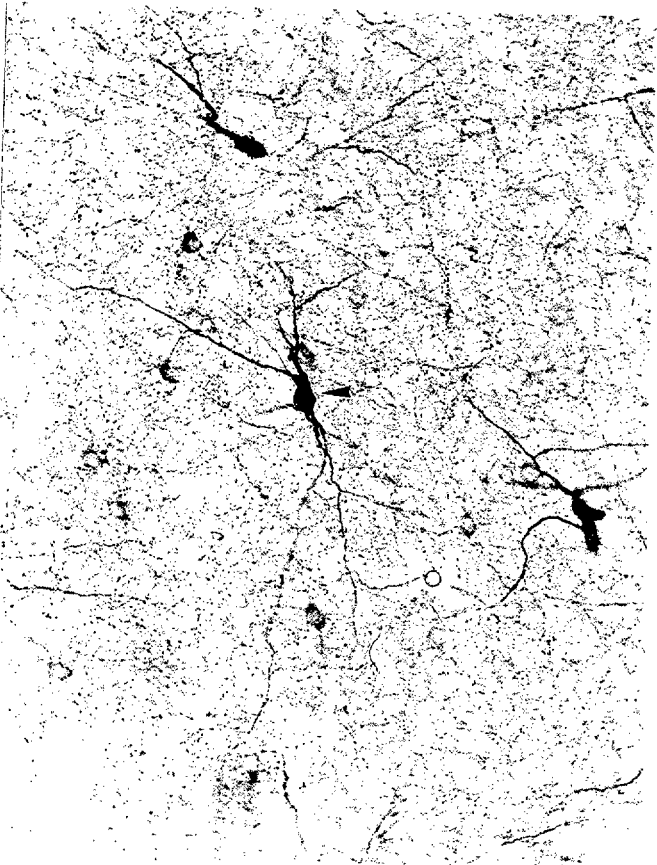




Fig. 123: Neurona bipeñachada. Cuerpo fusiforme y algo irregular. Orientación vertical. Área Par. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehído.

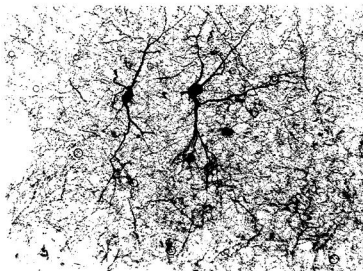


Fig. 124: Neuronas bipeñachadas. Cuerpos irregulares. Orientación vertical. Área Oc₂. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehído.

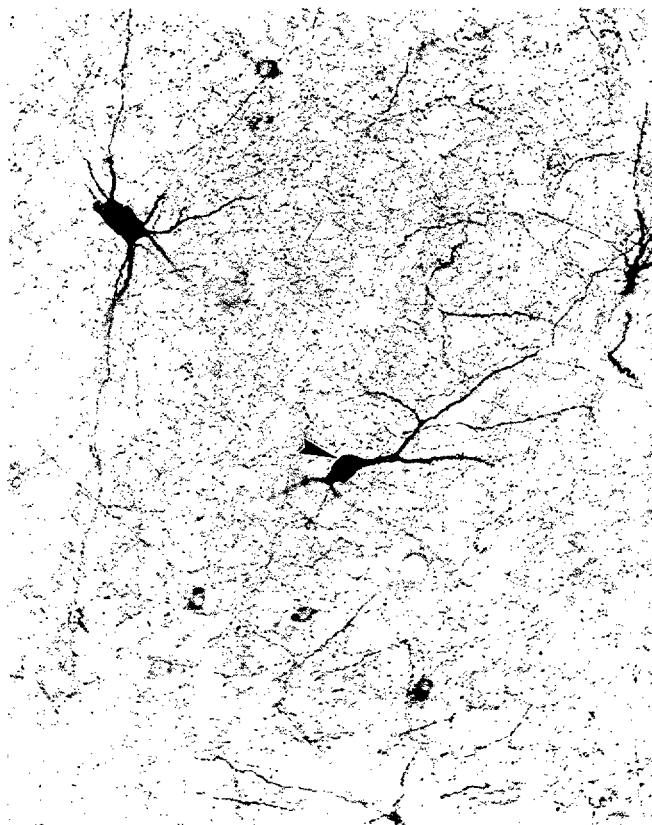


Fig. 125: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Orientación horizontal. Área Par. Capa VI. Animal adulto. Paraformaldehido.

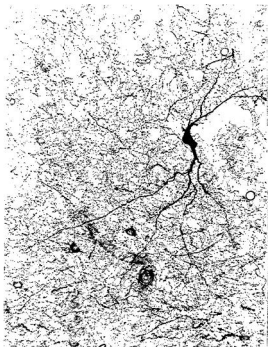


Fig. 126: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme e irregular con amplia ramificación dendrítica. Orientación vertical. Área Te. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 127: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme globoso. Orientación vertical. Área Te. Capa VI₁. Animal adulto. Paraformaldehido.

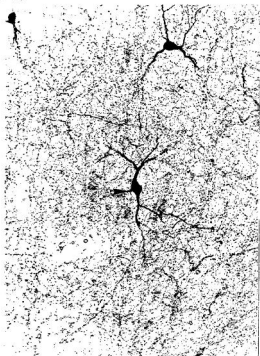




Fig. 128: Neurona bipolar. Cuerpo alargado y algo irregular. Orientación horizontal. Área Te. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

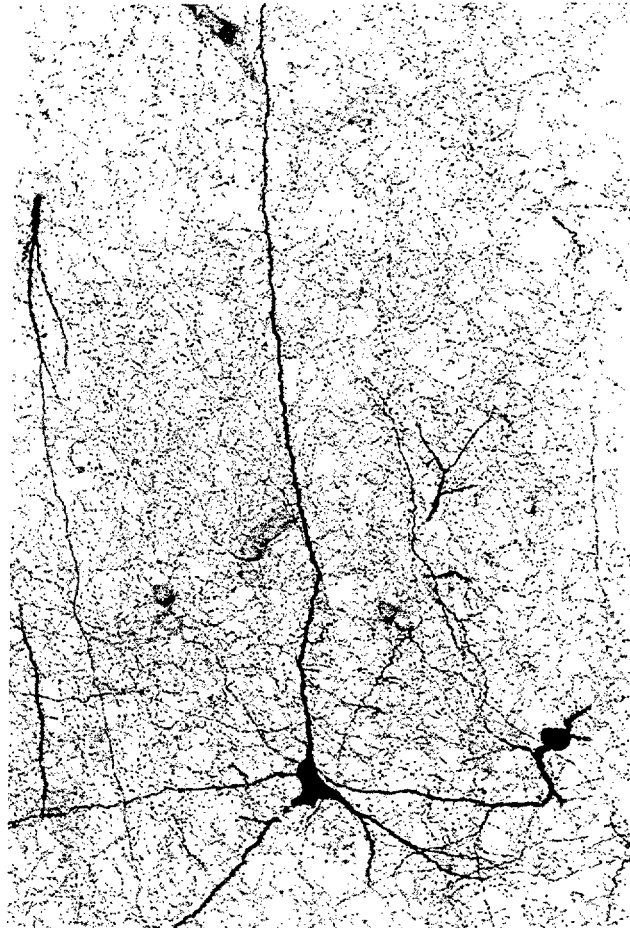


Fig. 129: Neurona piramidal de mediano tamaño. Área Par₂. Capa VI_a.
Animal adulto. Paraformaldehido.

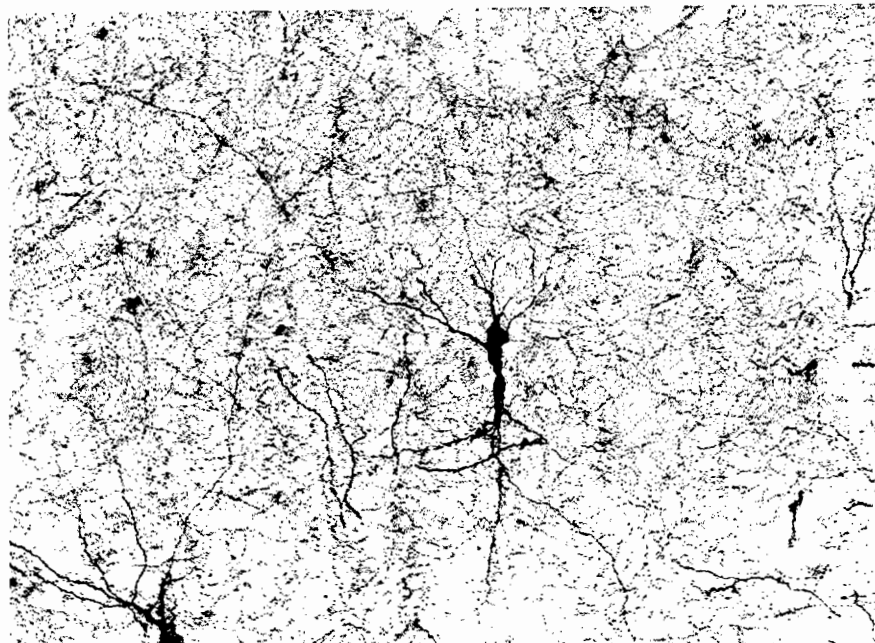


Fig. 130: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Orientación vertical. Área HL-FL. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

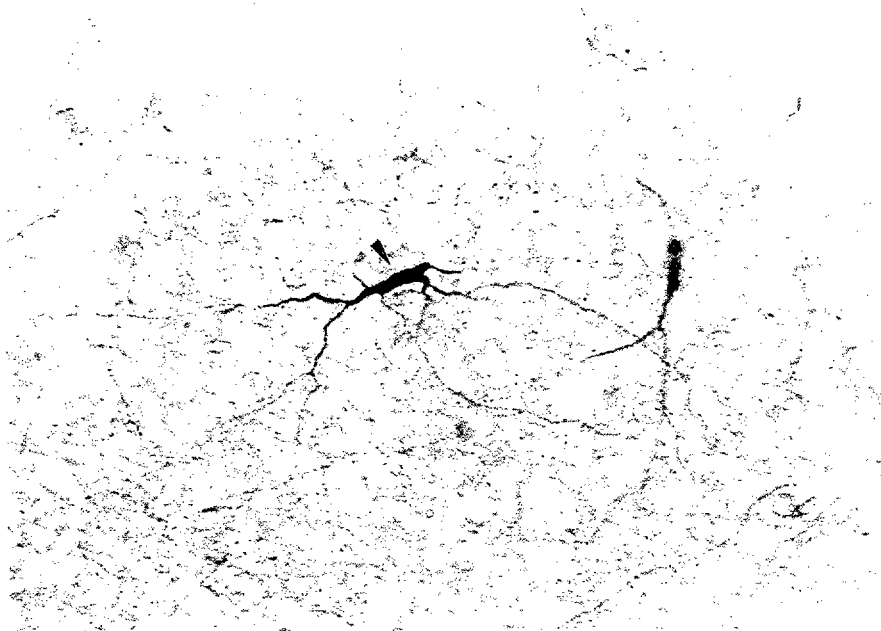


Fig. 131: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Orientación horizontal. Área Oc₂. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

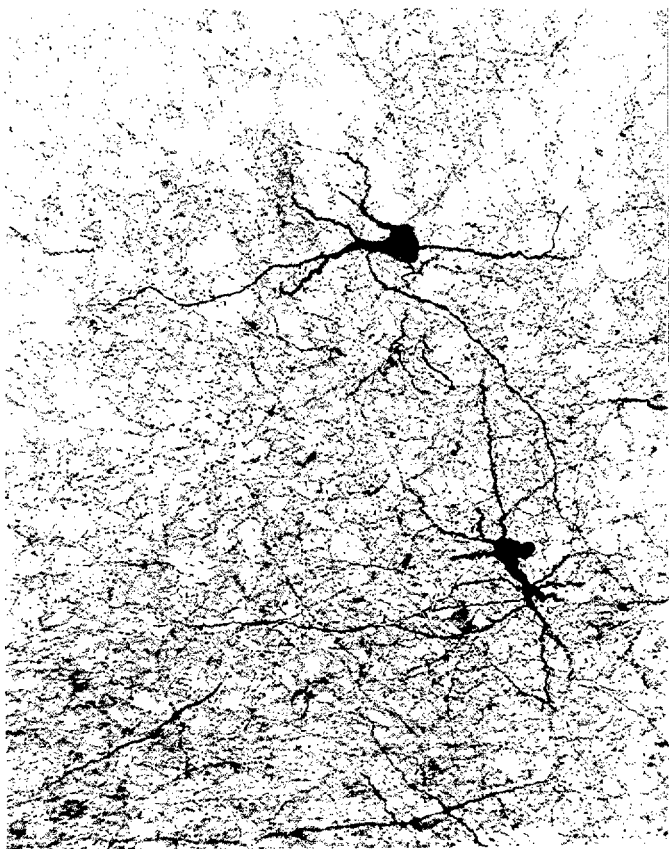


Fig. 132: Neurona atípica. Cuerpo alargado con prolongaciones somáticas. Aspecto multipolar. Neurona multipolar de cuerpo globoso y orientación horizontal. Área Oc₂. Capa VI_a. Animal dulto. Paraformaldehido.

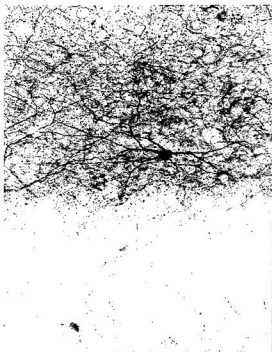


Fig. 133: Neurona multipolar. Cuerpo globoso con una orientación horizontal. Área Te. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehído.

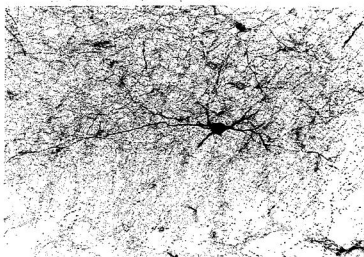


Fig. 134: Neurona multipolar. Cuerpo globoso y algo fusiforme. Orientación horizontal. Área RSG. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehído.

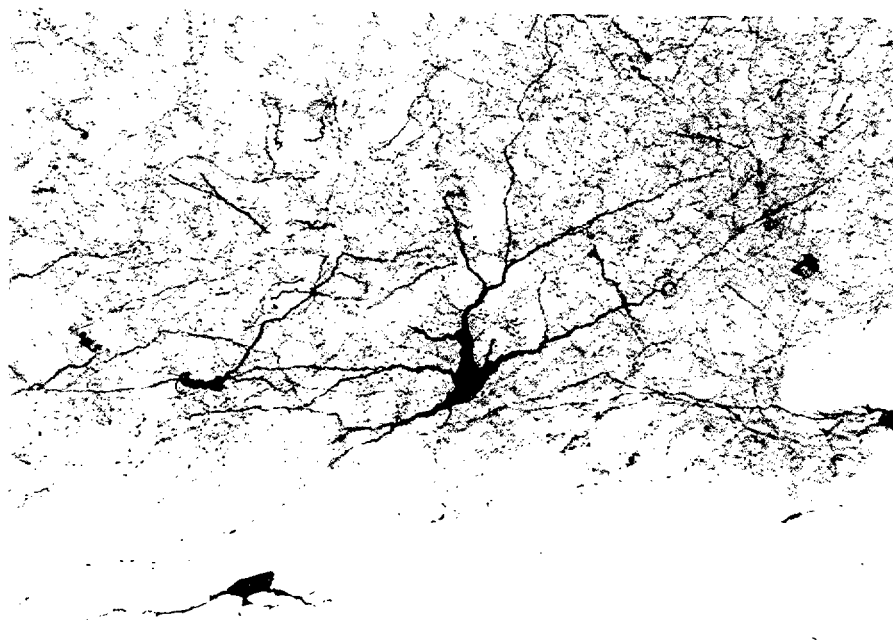


Fig. 135: Neurona multipolar. Cuerpo irregular. Área Te. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

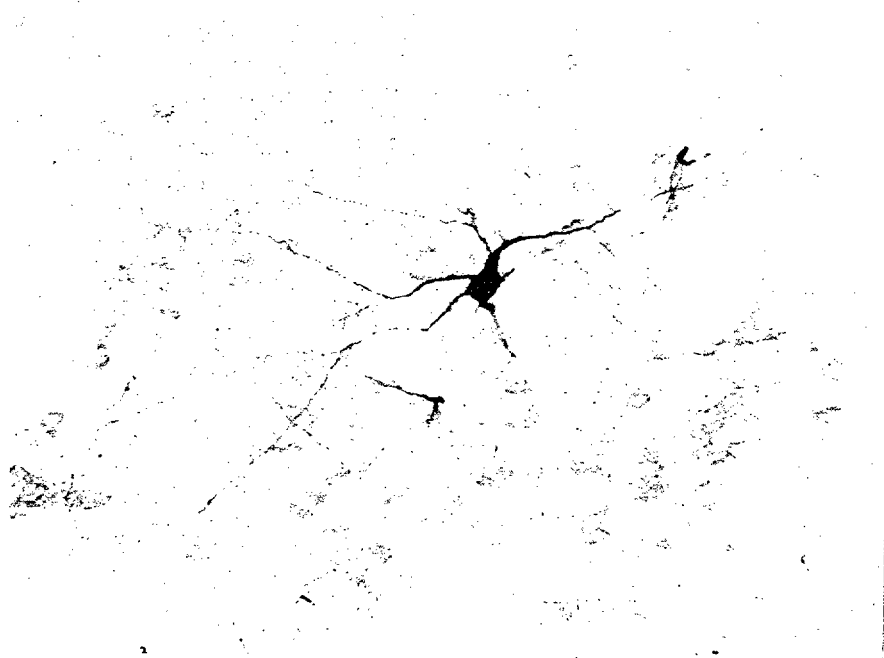


Fig. 136: Neurona multipolar. Cuerpo globoso y algo irregular. Área Par₂. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

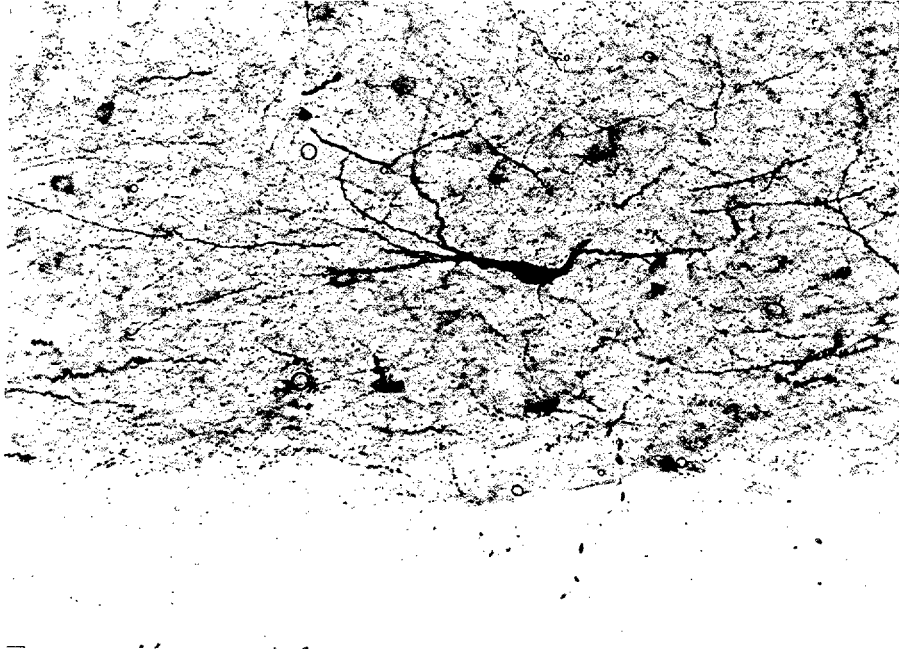


Fig. 137: Neurona bipenachada. Cuerpo irregular y alargado. Orientación horizontal. Área Te. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.



Fig. 138: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Orientación algo horizontal. Área Te₁. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

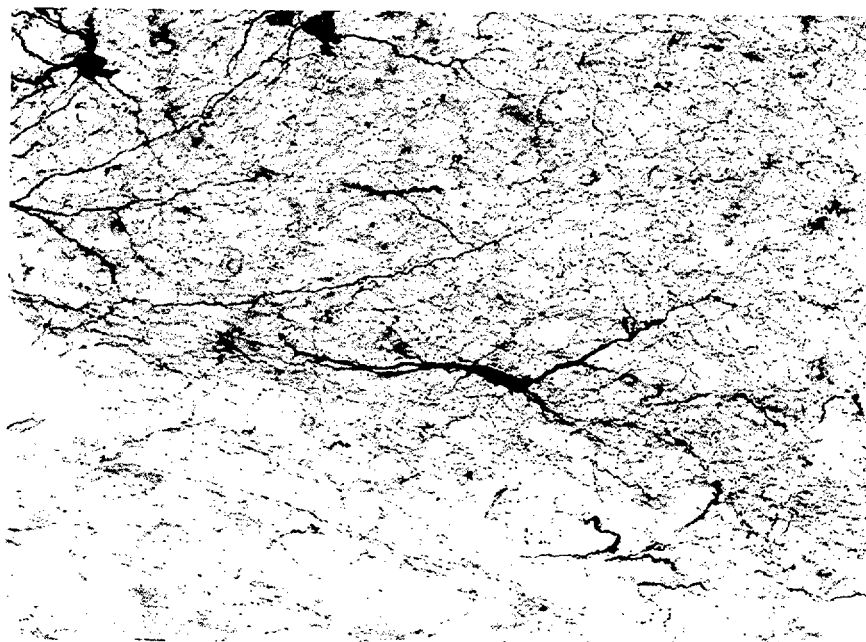


Fig. 139: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado y algo irregular. Orientación horizontal. Escasas ramificaciones. Área Par₁. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

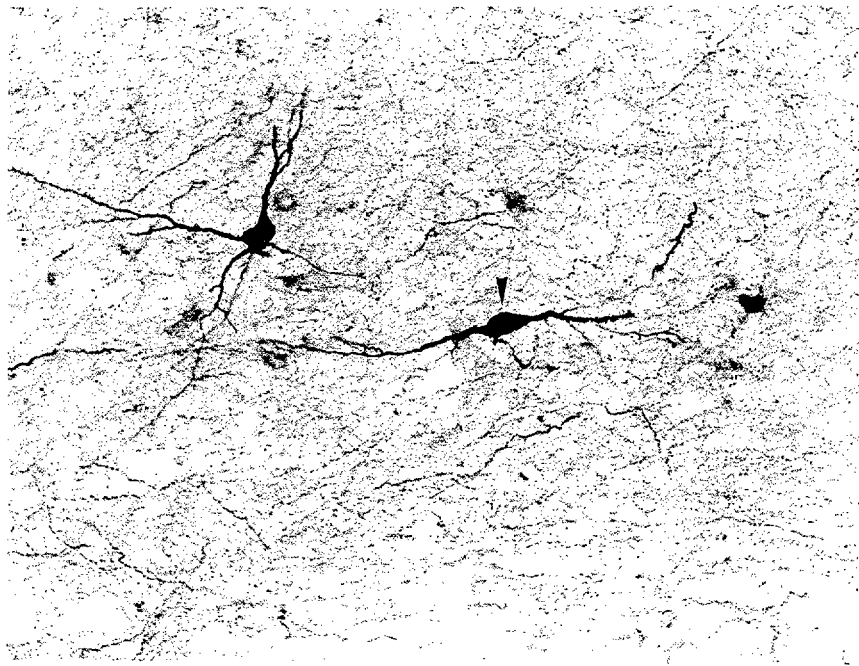


Fig. 140: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Escasas ramificaciones. Orientación horizontal. Área Par₂. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

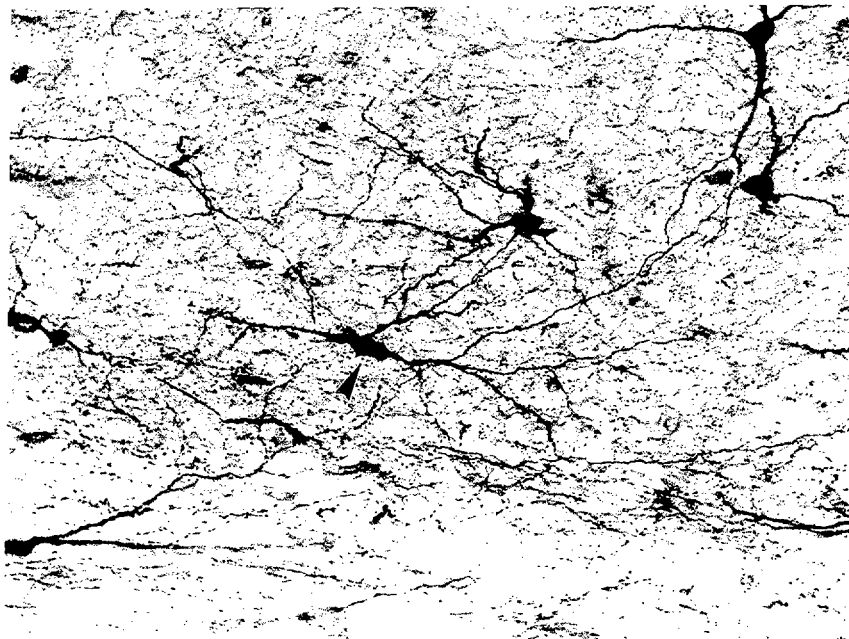


Fig. 141: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme e irregular. Orientación horizontal. Área Par₁. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

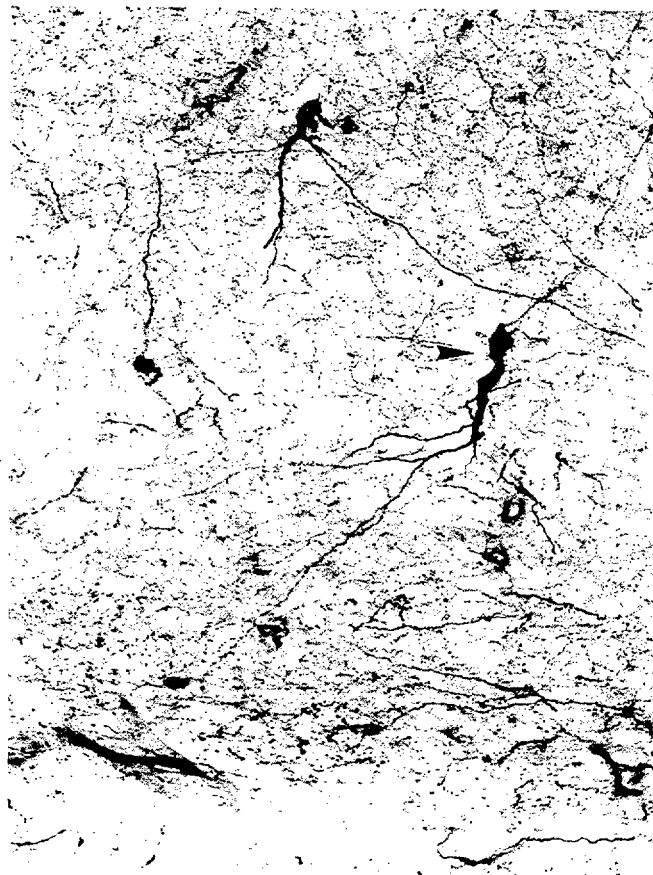


Fig. 142: Neurona atípica. Cuerpo alargado e irregular. Grande en relación al árbol dendrítico. Orientación vertical. Área Fr₁. Capa VI_b. Animal adulto. Paraformaldehido.

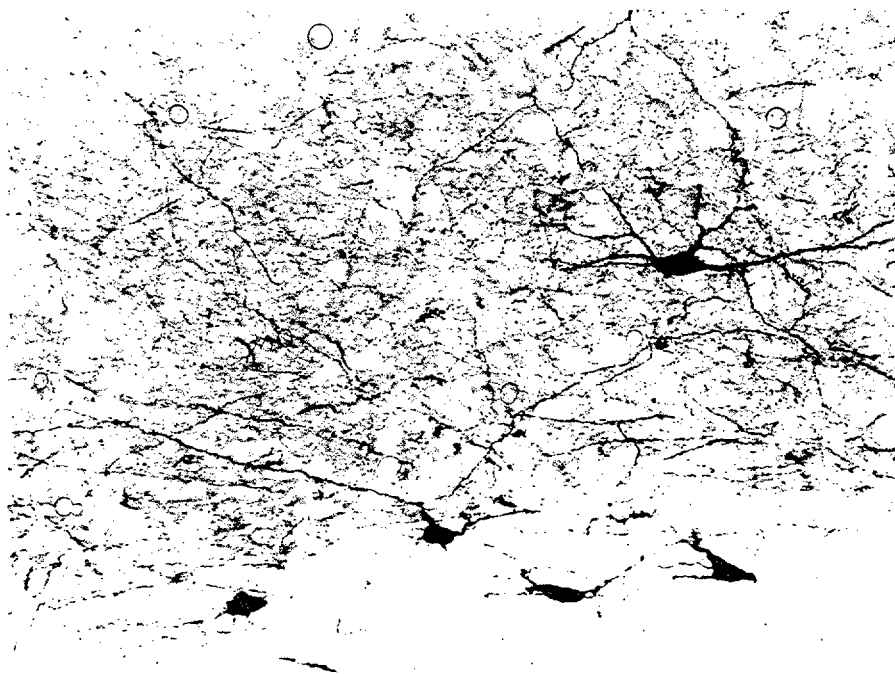


Fig. 143: Neuronas en grupo horizontal en la cápsula externa, en relación con una neurona multipolar de la capa VI. Animal adulto. Paraformaldehido.

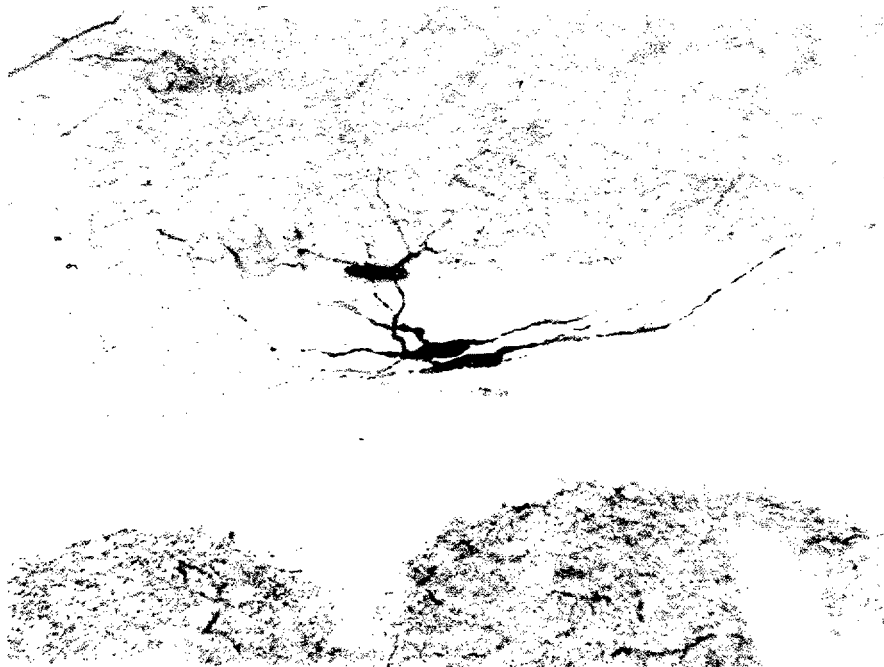


Fig. 144: Neuronas bipolares localizadas en un grupo de disposición vertical. Área Par_2 . Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.



Fig. 145: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado entre los haces de fibras mielínicas. Área Oc₂. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

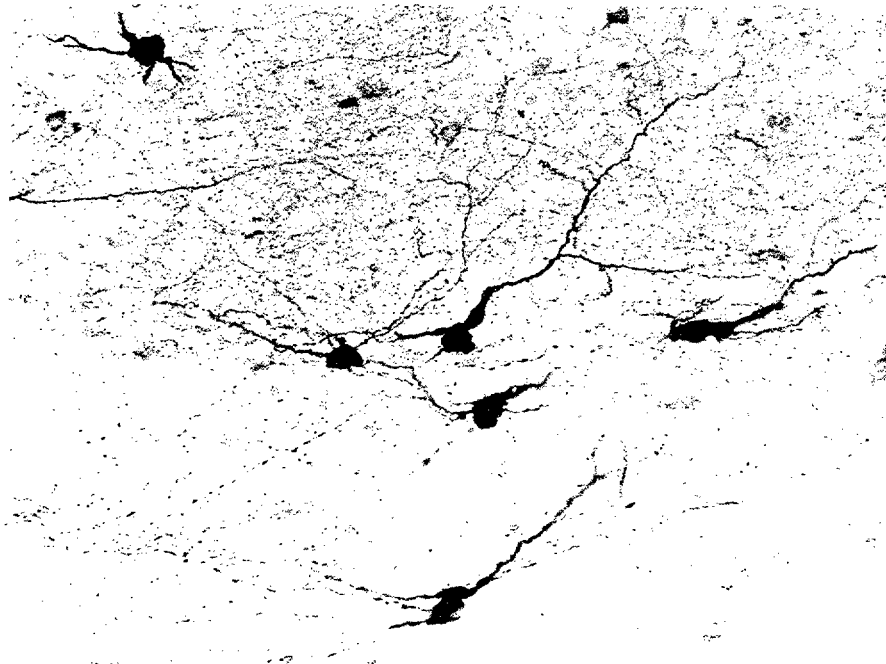


Fig. 146: Neuronas en grupo situadas entre la cápsula externa y la capa VI_b. Entre ellas se observan células atípicas. Área Par₂. Animal adulto. Paraformaldehido.

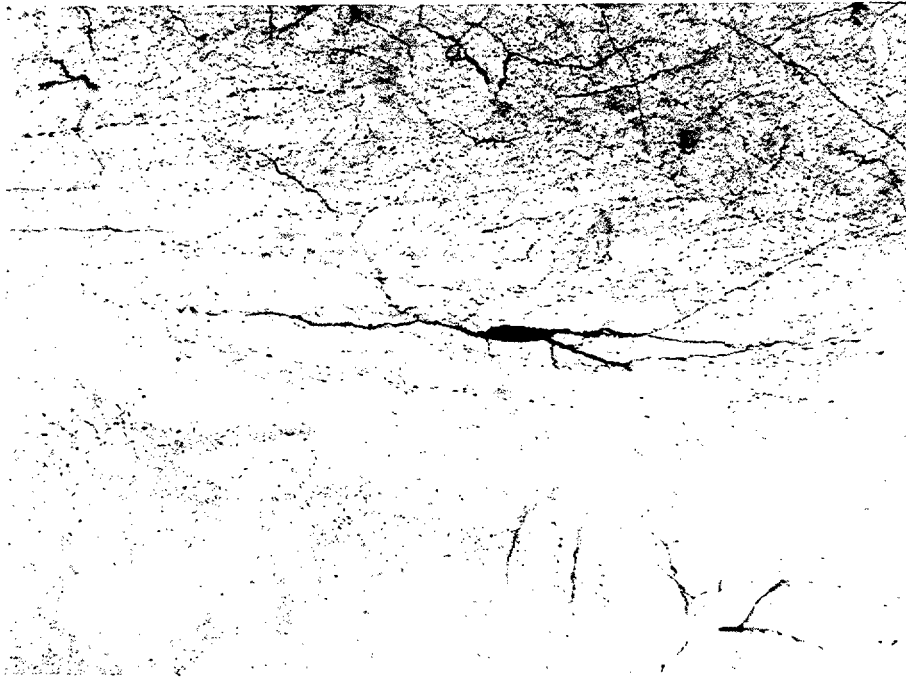


Fig. 147: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado y aplastado entre las fibras mielínicas. Área RSA. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

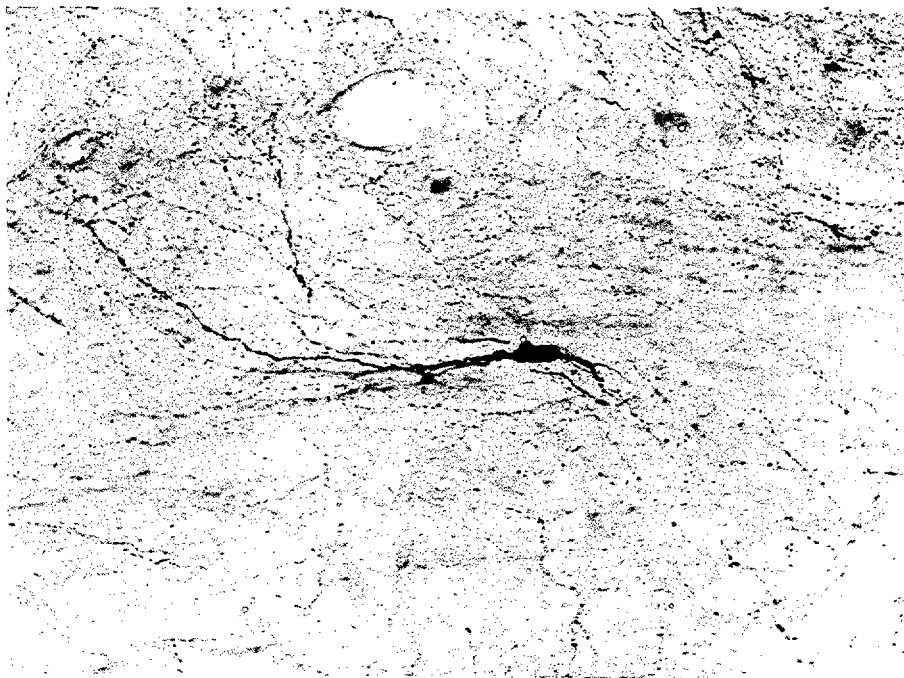


Fig. 148: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado y aplastado entre los haces de fibras mielínicas. Área Oc₁. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

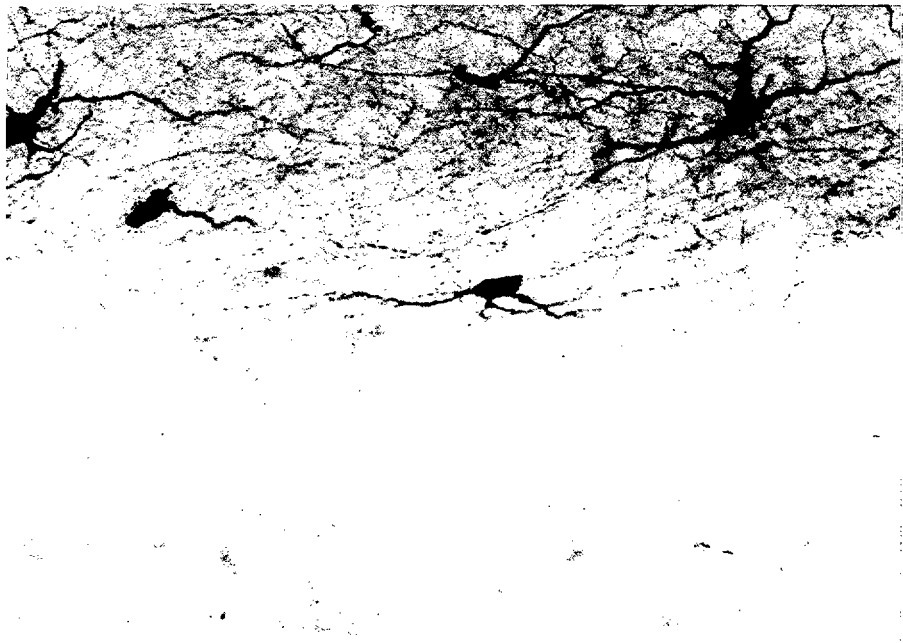


Fig. 149: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Orientación horizontal. Relacionada con neuronas de la capa VI. Área Te. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

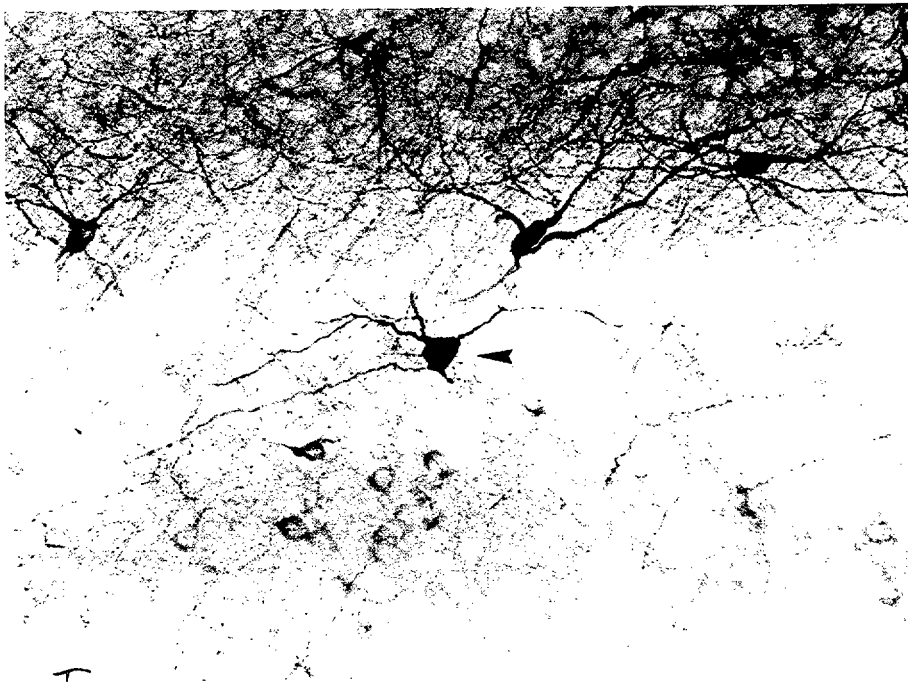


Fig. 150: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Aspecto algo estrellado. Relacionada con neuronas de la capa VI. Área Te. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

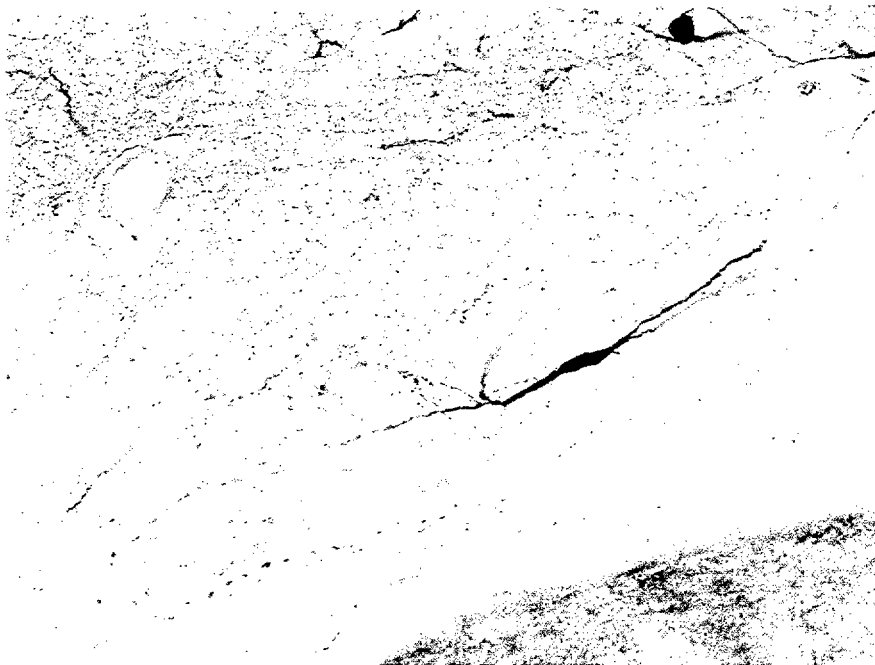


Fig. 151: Neurona bipolar. Cuerpo alargado y aplanado entre las fibras mielínicas. Área Par₂, Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

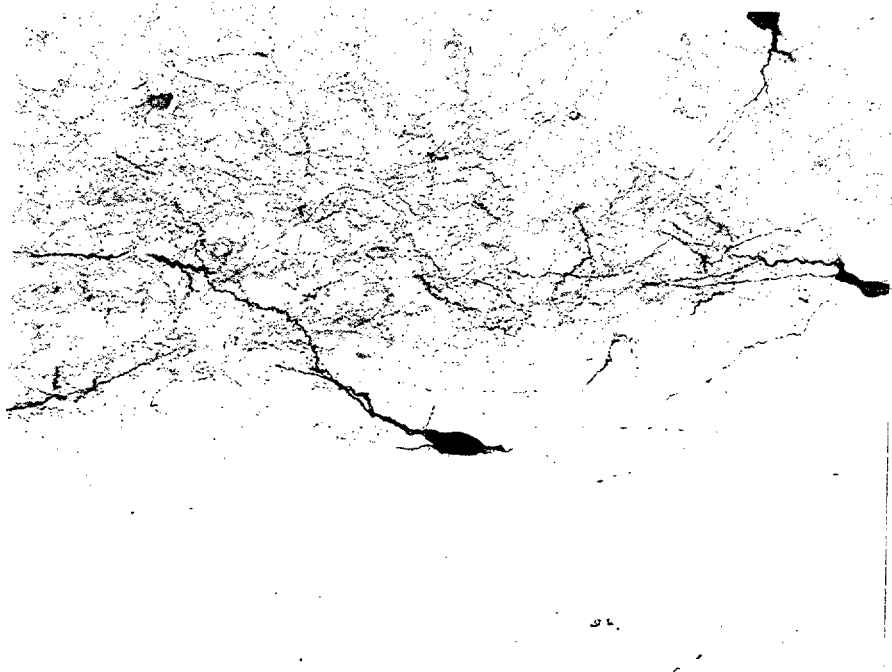


Fig. 152: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado entre las fibras mielínicas. Área Te. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

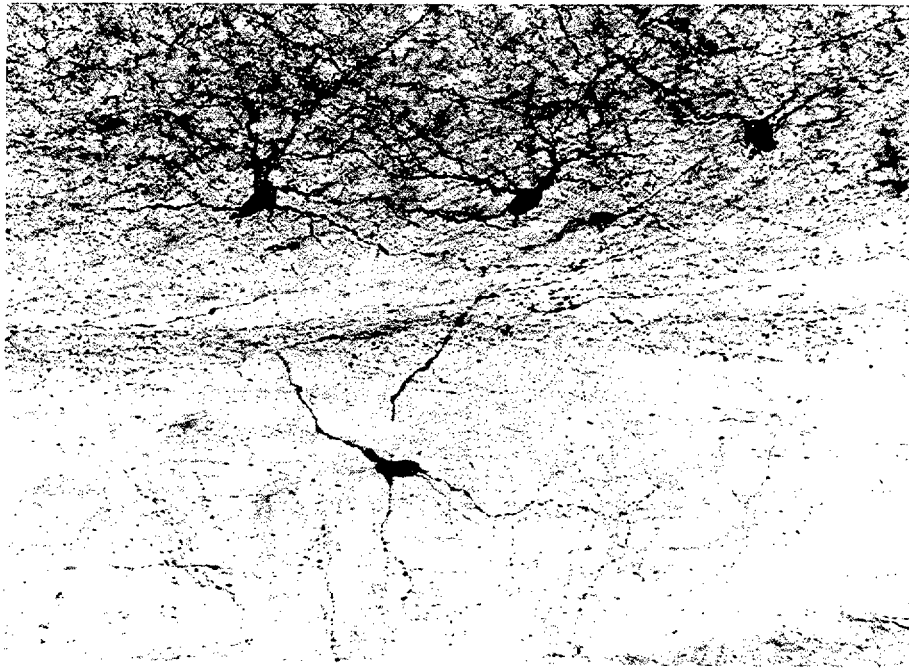


Fig. 153: Neurona multipolar. Escasa ramificación. Relacionada con un grupo de la capa VI_b. Área Oc_{2M}. Cápsula externa. Animal adulto. Paraformaldehido.

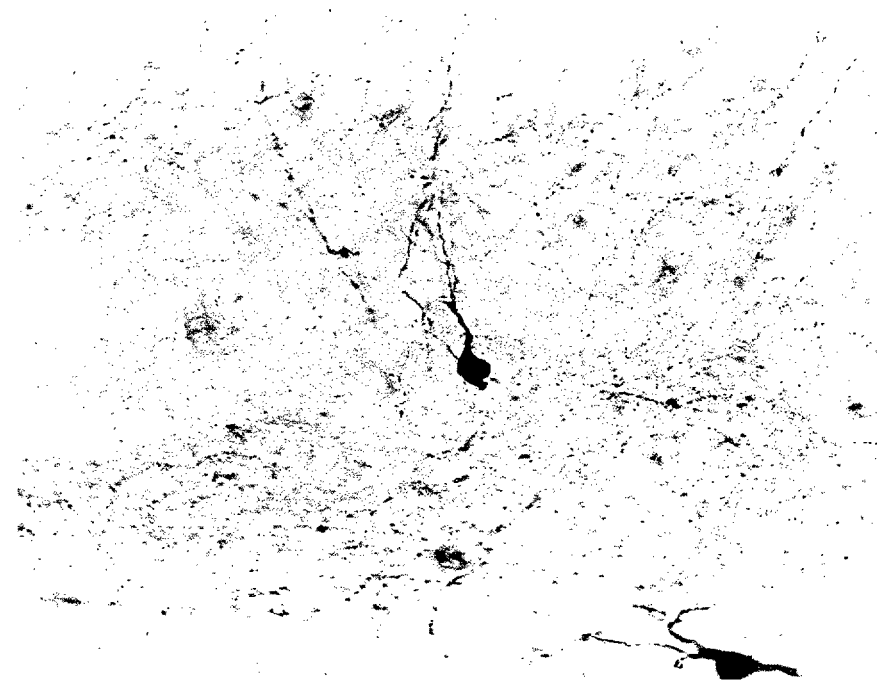


Fig. 154: Neurona bipenachada. Cuerpo globoso. Orientación vertical. Cingulum. Animal adulto. Paraformaldehido.

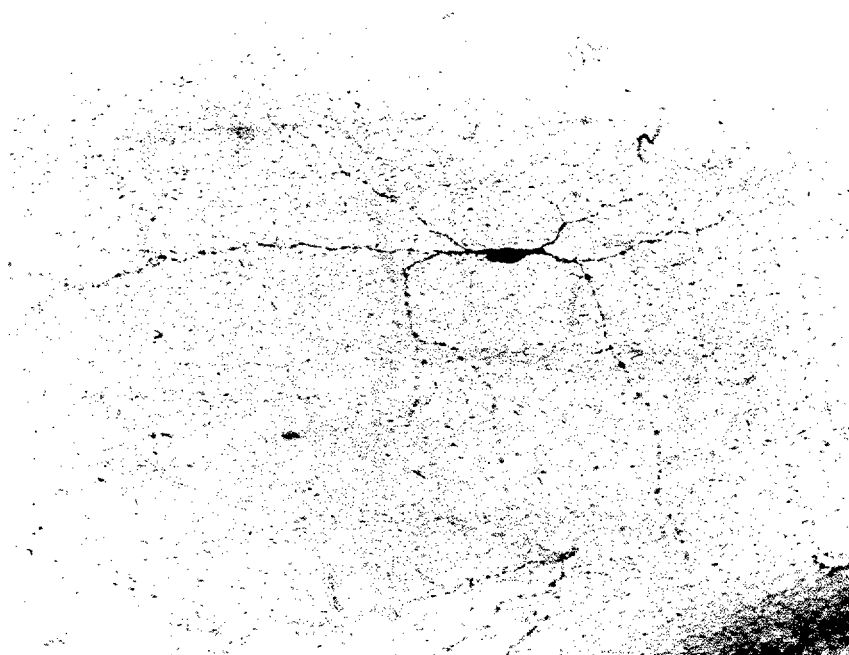


Fig. 155: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado. Árbol dendrítico "arrosariado". Comisura blanca anterior. Animal adulto. Paraformaldehido.

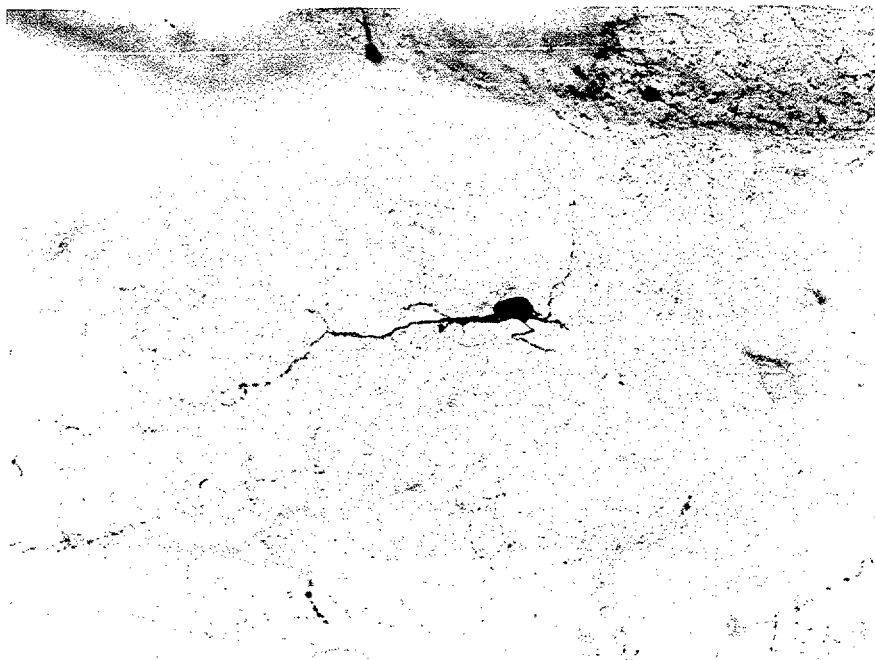


Fig. 156: Neurona bipenachada. Cuerpo excéntrico. Escasas ramificaciones. Cuerpo calloso. Animal adulto. Paraformaldehido.

Animales viejos



Fig. 157: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme. Área Par. Capa VI. Animal viejo. Paraformaldehido.

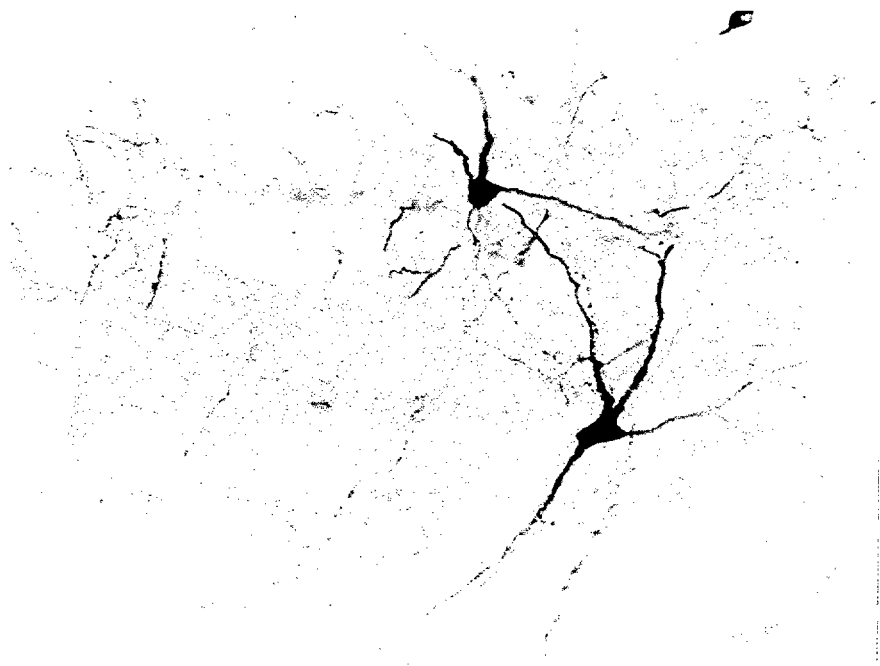


Fig. 158: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Cápsula externa.
Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Área Fr. Capa VI_b. Animal viejo.
Paraformaldehido.

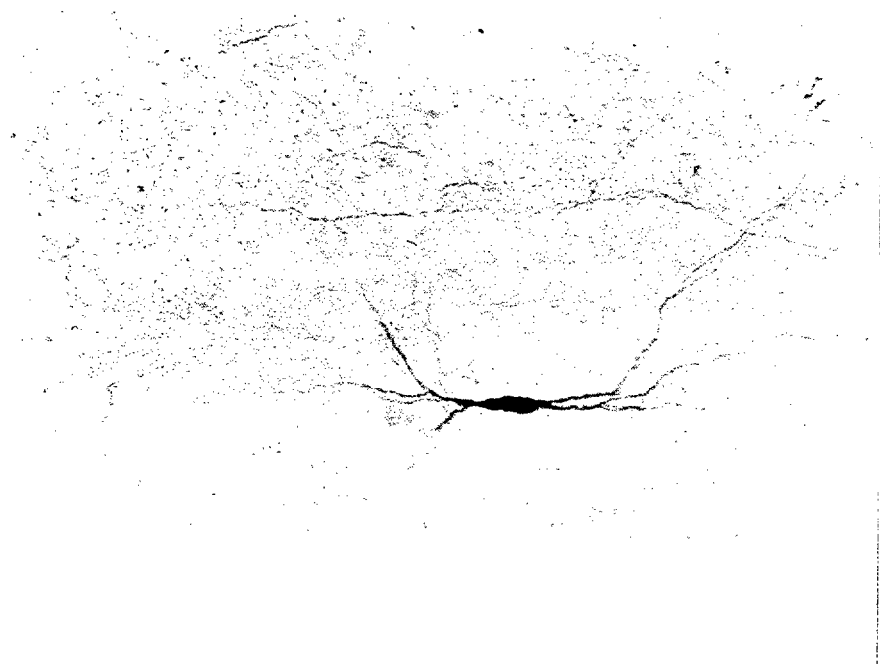


Fig. 159: Neurona bipenachada. Cuerpo alargado situado entre las fibras
mielínicas. Área Par. Cápsula externa. Animal viejo. Paraformaldehido.

Agrupaciones neuronales

Animales adultos

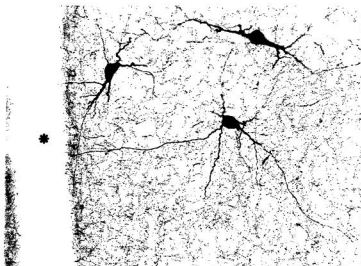


Fig. 160: Grupo de pocas neuronas. Varios tipos neuronales. Área Oc₂. Capa II/III. Animal adulto. Paraformaldehido. (* vaso sanguíneo).

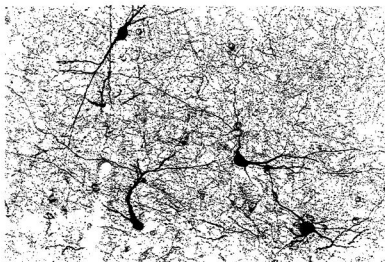


Fig. 161: Grupo de pocas neuronas. Tipología variada. Área Par. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

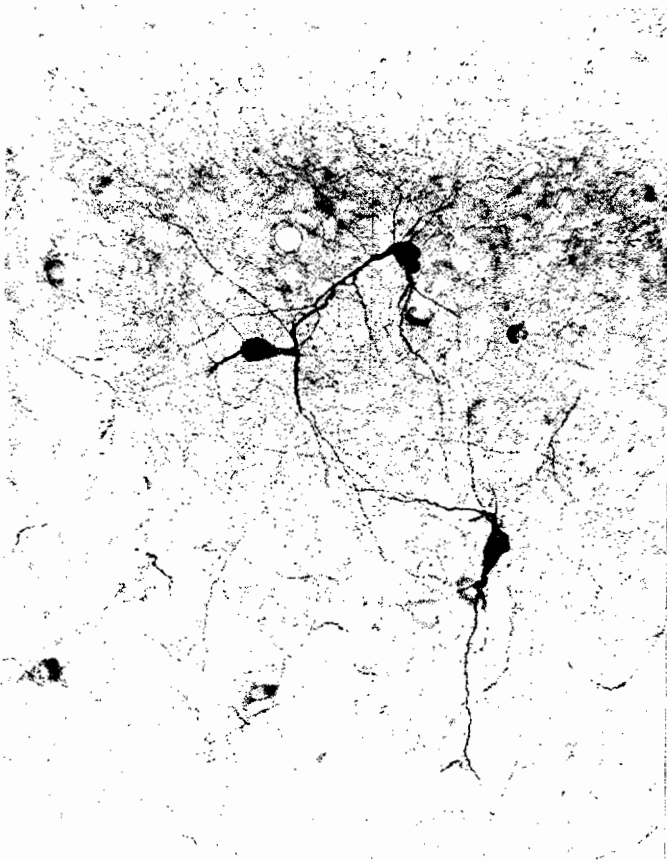


Fig. 162: Grupo de pocas neuronas de pequeño tamaño. Tipología variada. Área Te. Capas II-IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

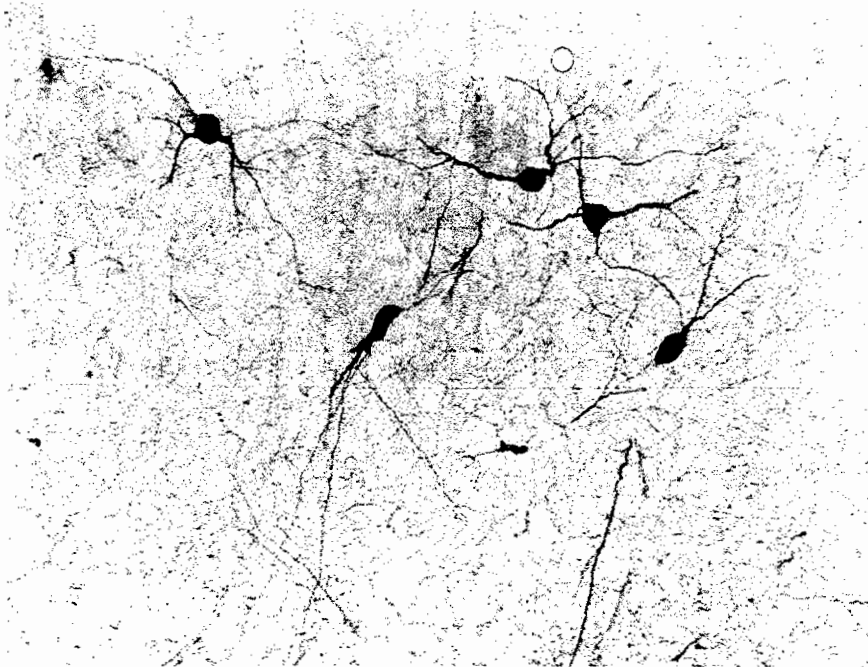


Fig. 163: Grupo de neuronas de pequeño tamaño. Variedad de tipos. Área OC_{2M}. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

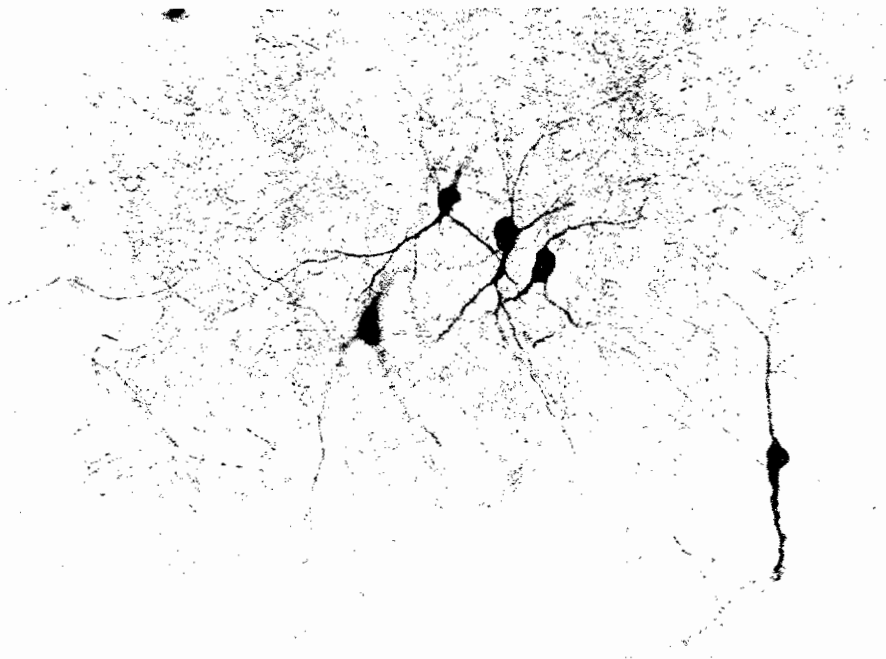


Fig. 164: Grupo de neuronas en línea horizontal algo oblicua. Área Te_1 . Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

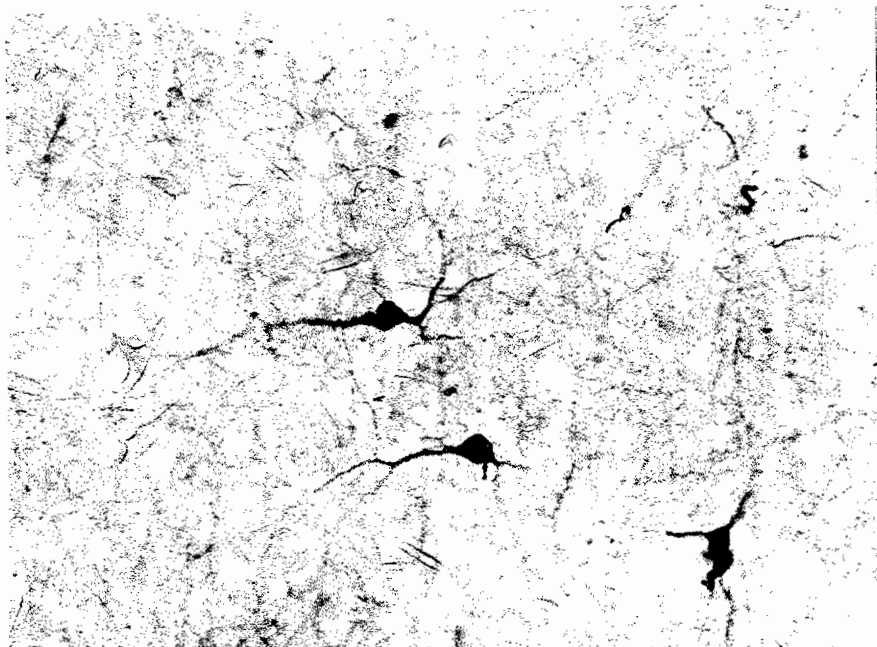


Fig. 165: Grupo de neuronas en línea vertical. Tipología variada. Área Par. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

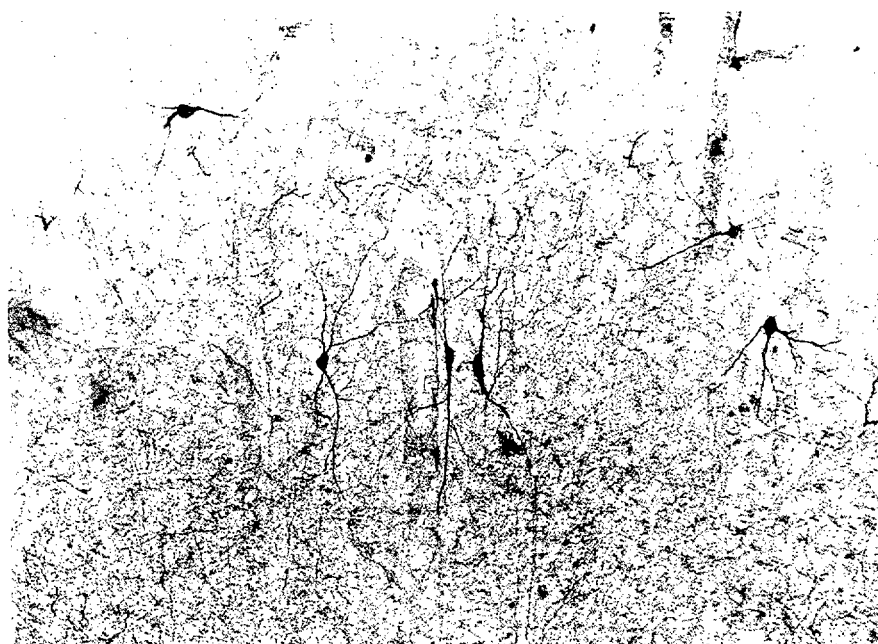


Fig. 166: Grupo de neuronas en línea horizontal. Área HL-FL. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehido.

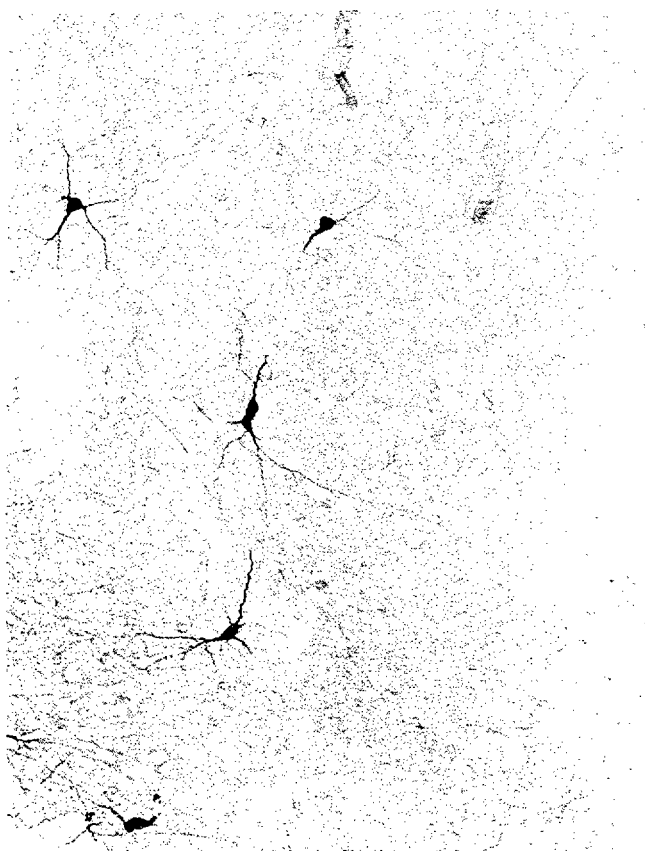


Fig. 167: Grupo de neuronas en línea vertical. Área Te. Capas IV-V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 168: Agrupaciones de grupos de la capa VI_p con grupos de la capa II-IV. Area Fr. Animal adulto. Paraformaldehido.

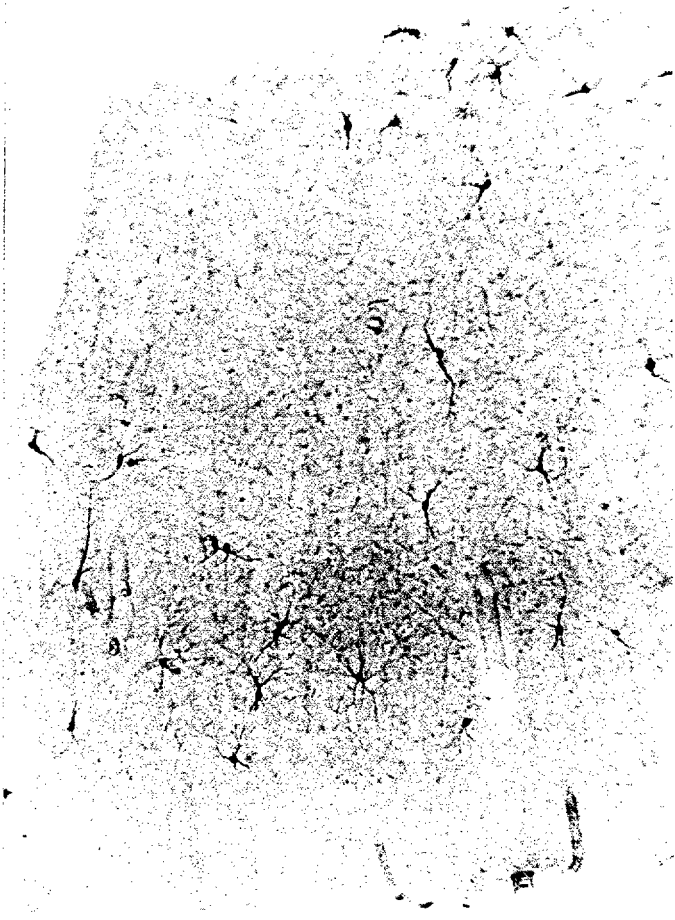
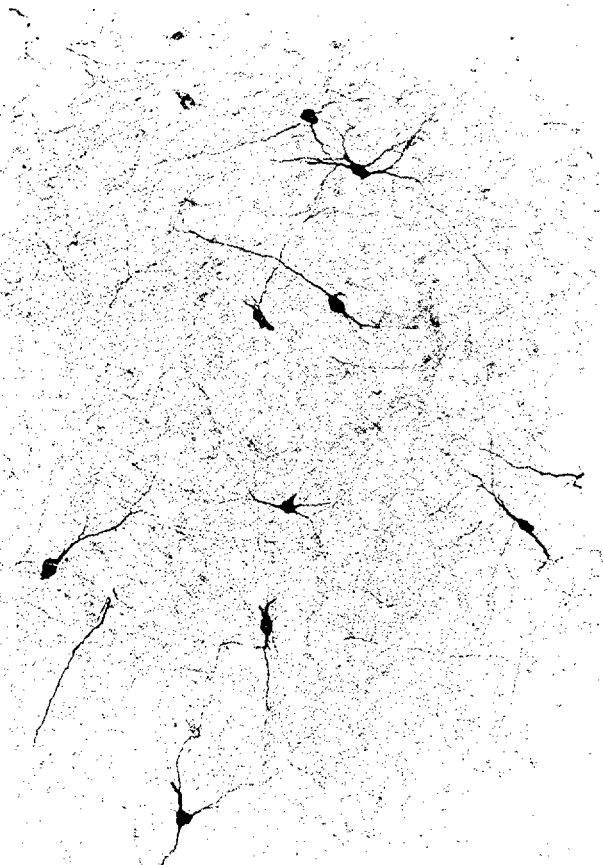


Fig. 169: Agrupaciones de grupos. Area Te. Capa VI. Animal adulto. Paraformaldehido.



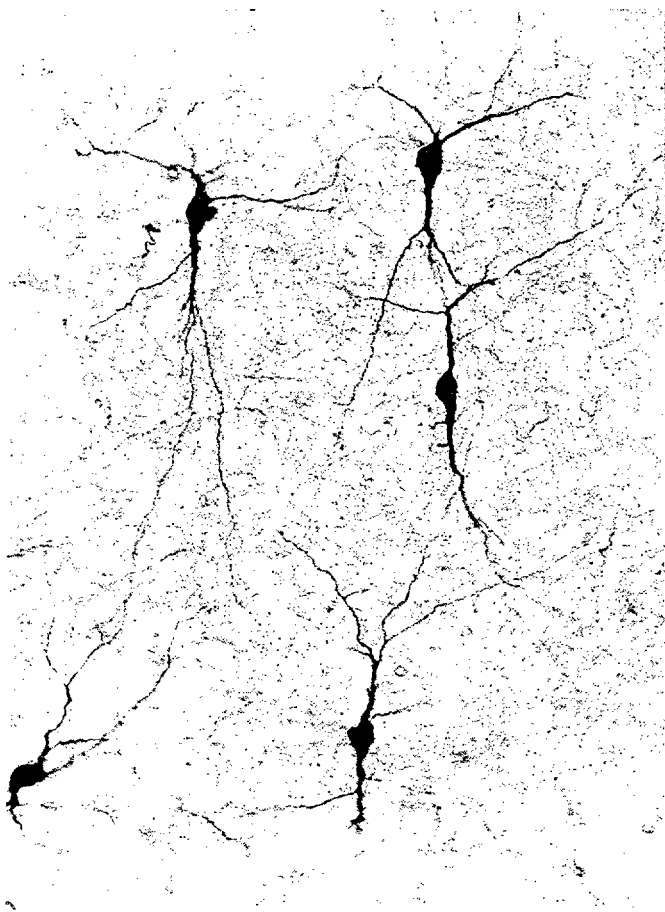


Fig. 170: Grupo de neuronas mayoritariamente bipenachadas. Área Par. Capa VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

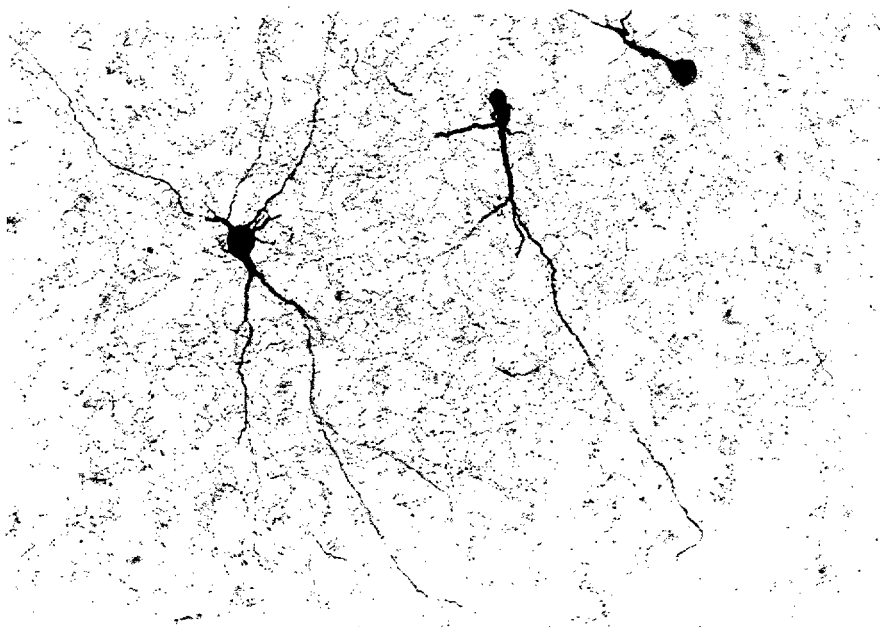


Fig. 171: Grupo de neuronas colocadas en línea horizontal. Área Par. Capa V-VI_a. Animal adulto. Paraformaldehido.

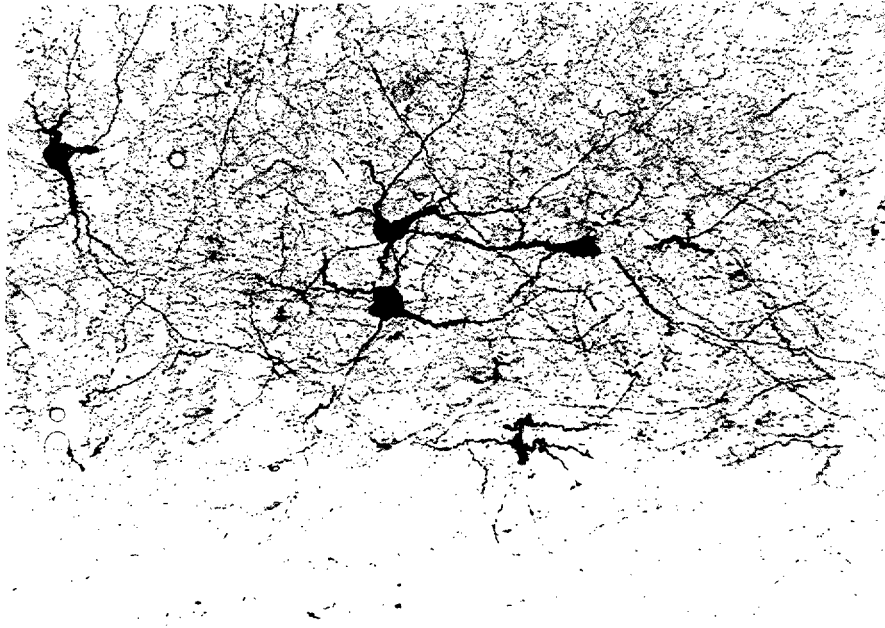


Fig. 172: Grupo en capa VI_b con neuronas irregulares relacionadas con células de la sustancia blanca. Tipología variada. Área Oc_{2L}. Animal adulto. Paraformaldehido.

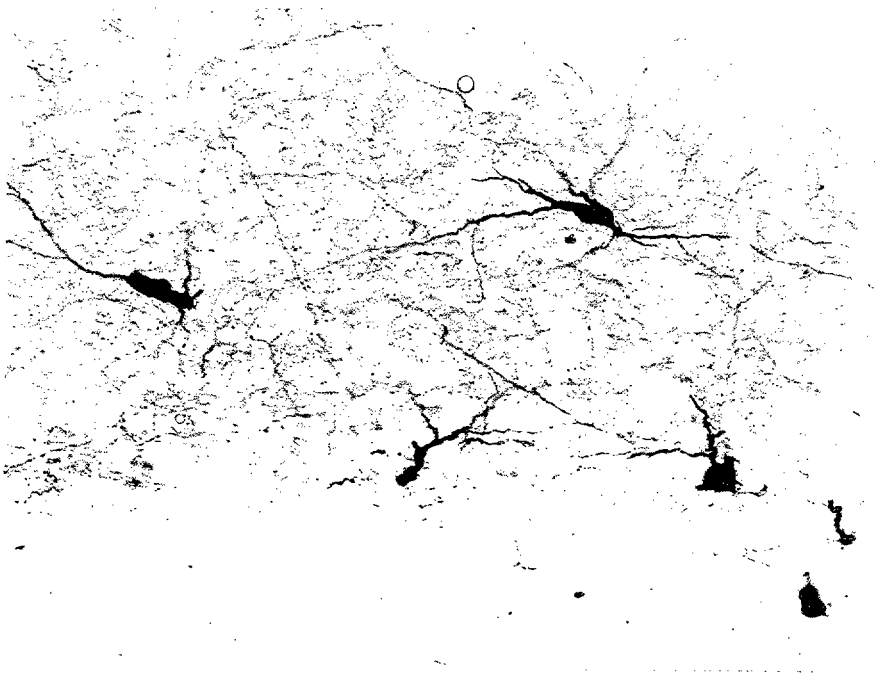


Fig. 173: Grupo de neuronas en la capa VI_b. Aspecto irregular. Área Oc₂. Animal adulto. Paraformaldehido.

Animales jóvenes

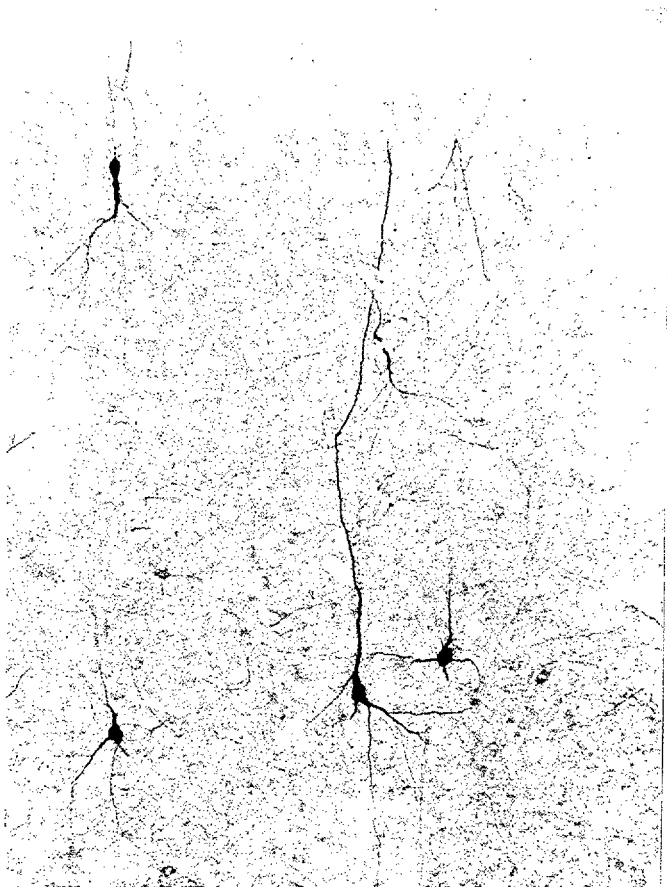


Fig. 174: Neurona piramidal que forma parte de un grupo de línea horizontal. Área Par. Capa V/VI. Animal joven. Glutaraldehido.

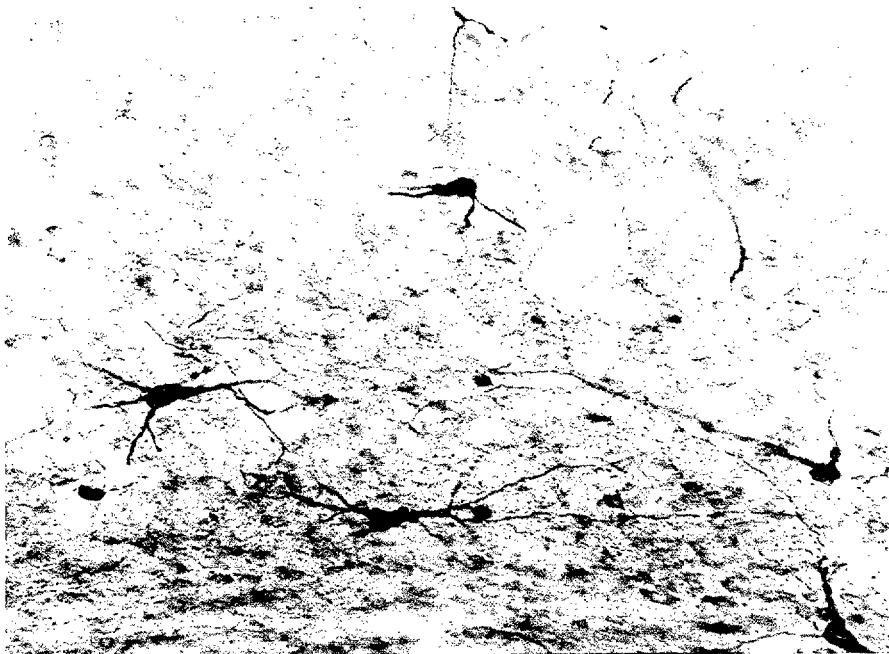


Fig. 175: Grupo de neuronas de aspecto multipolar y algo atípico. Área Fr/Par. Capa VI_b. Animal joven. Glutaraldehido.

Animales adultos

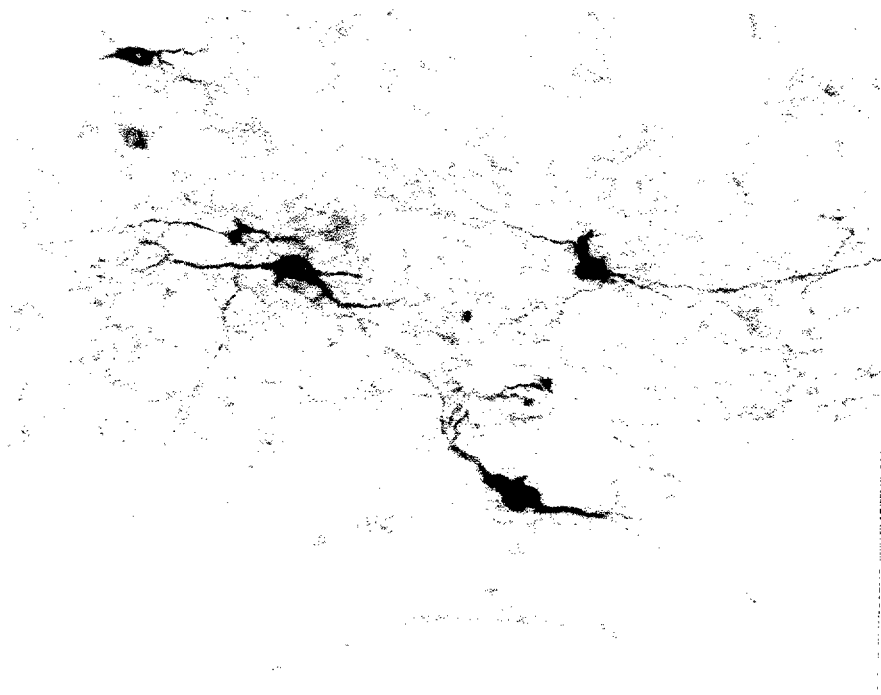


Fig. 176: Grupo de neuronas que ocupan la capa VI_e y la cápsula externa. Se observa la irregularidad de los cuerpos neuronales. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

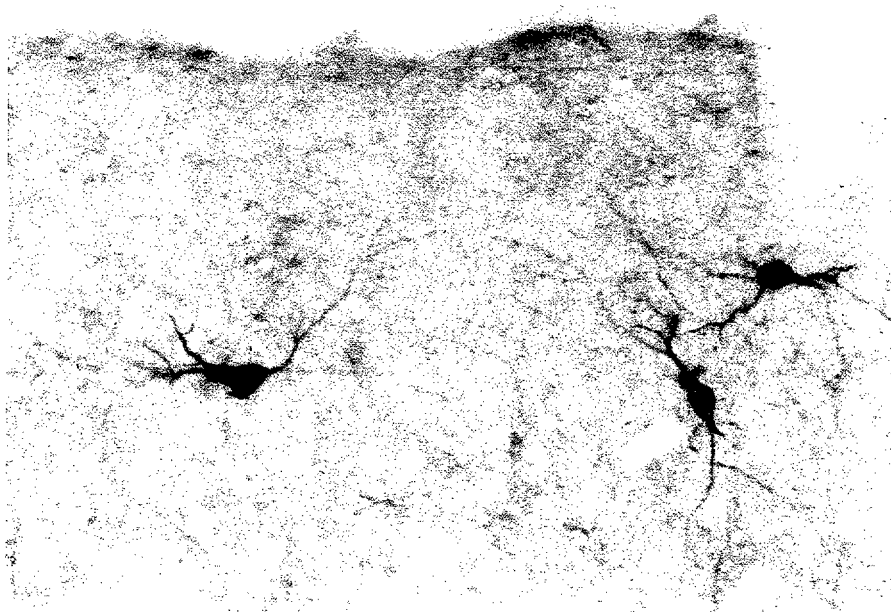


Fig. 177: Grupo neuronal de la capa II. Neuronas de mediano tamaño. Área Par. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

Células piramidales

Animales jóvenes

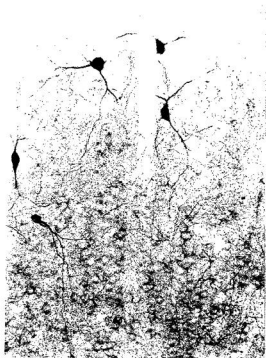


Fig. 178: Detalle de las capas II-IV de un animal de un mes. Se observan neuronas no piramidales marcadas en su totalidad, agrupadas alrededor de un vaso, y neuronas marcadas en su soma. Área Fr. Glutaraldehído.

Fig. 179: Detalle de las capas V-VI de un animal de un mes. Se observan piramidales, marcadas en su soma, y una no piramidal marcada en su totalidad. Área Par. Glutaraldehído.



células piramidales

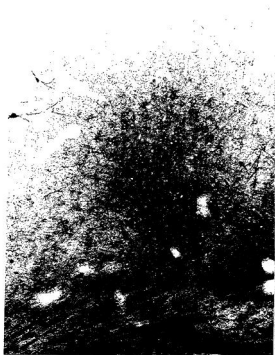


Fig. 180: Animal de un mes.
Columna de pequeño tamaño.
Área HL. Capa VI. Glutaraldehido.

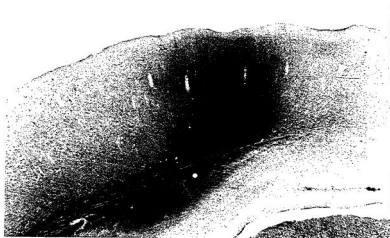


Fig. 181: Animal de un mes. Se observan las cortezas Fr y motoras de las extremidades. Columna alta. Glutaraldehido.

Animales adultos

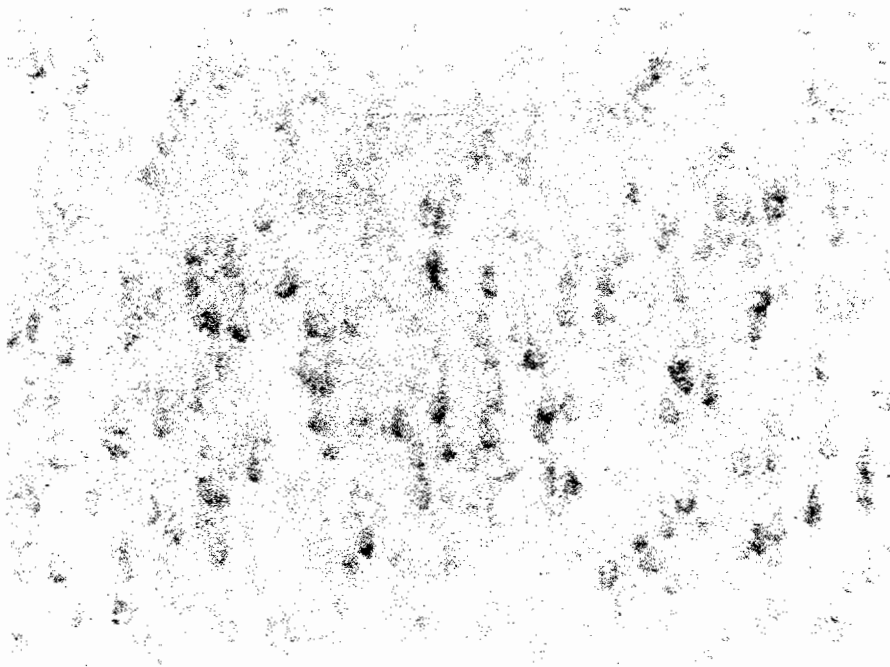


Fig. 182: Detalle de una capa V. Área HL. Se observan somas piramidales. NOS endotelial. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

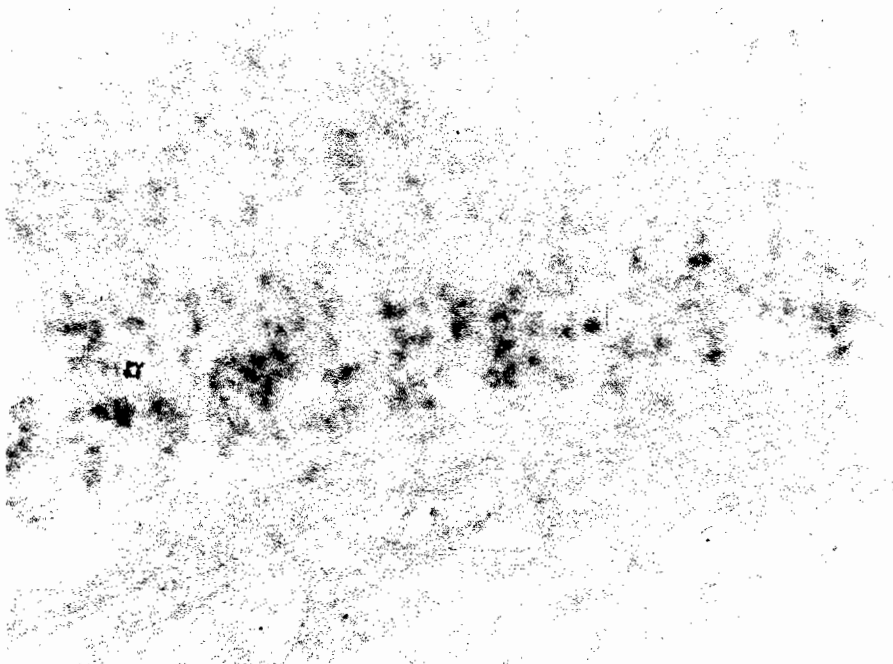
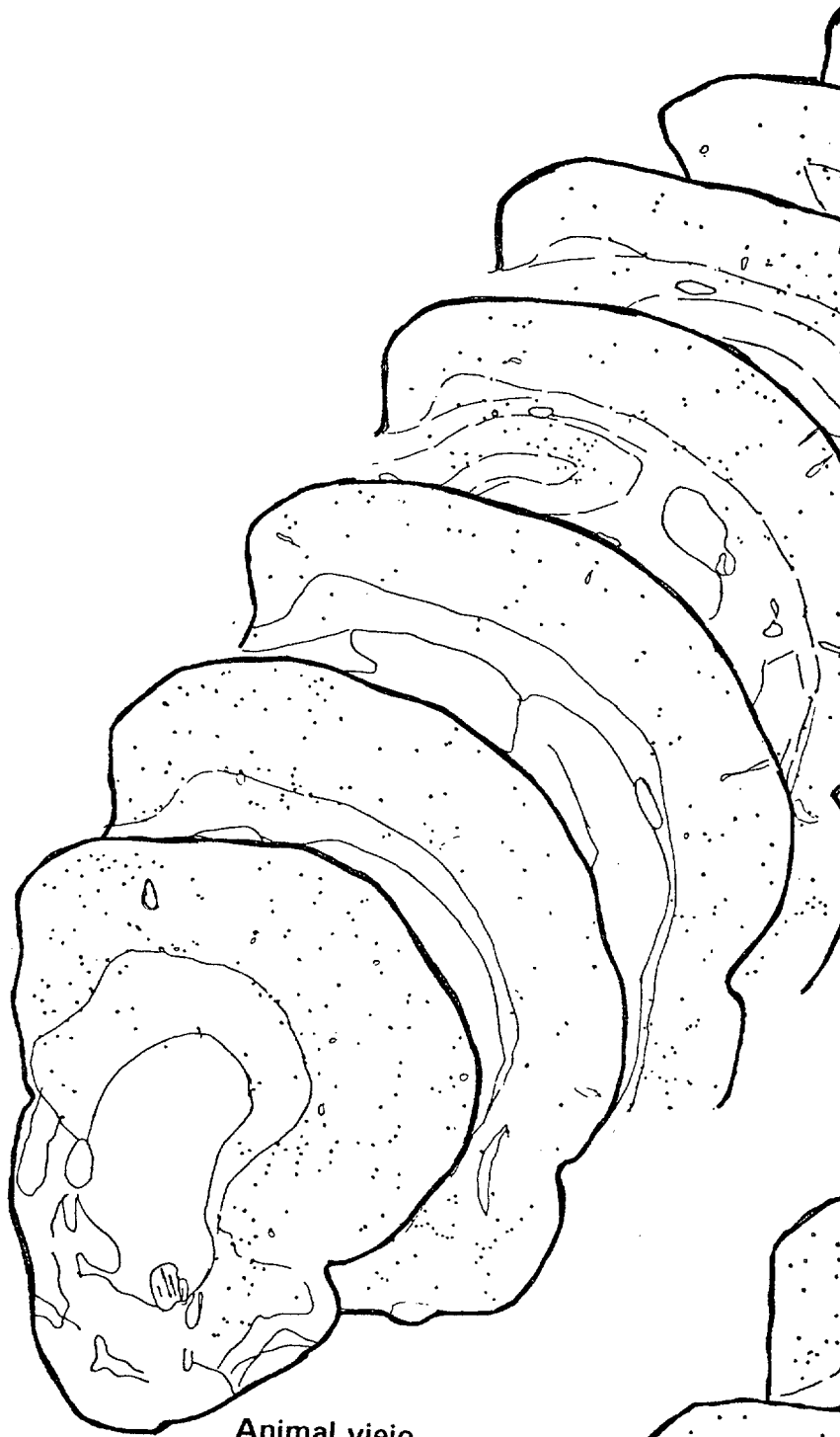


Fig. 183: Detalle de la capa VI. Neuronas marcadas. Área HL. NOS endotelial. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

Distribución neuronal



Animal viejo





Animal adulto

Fig. 184: Composición panorámica de reproducciones a cámara clara de un animal adulto y otro viejo.

Animales adultos

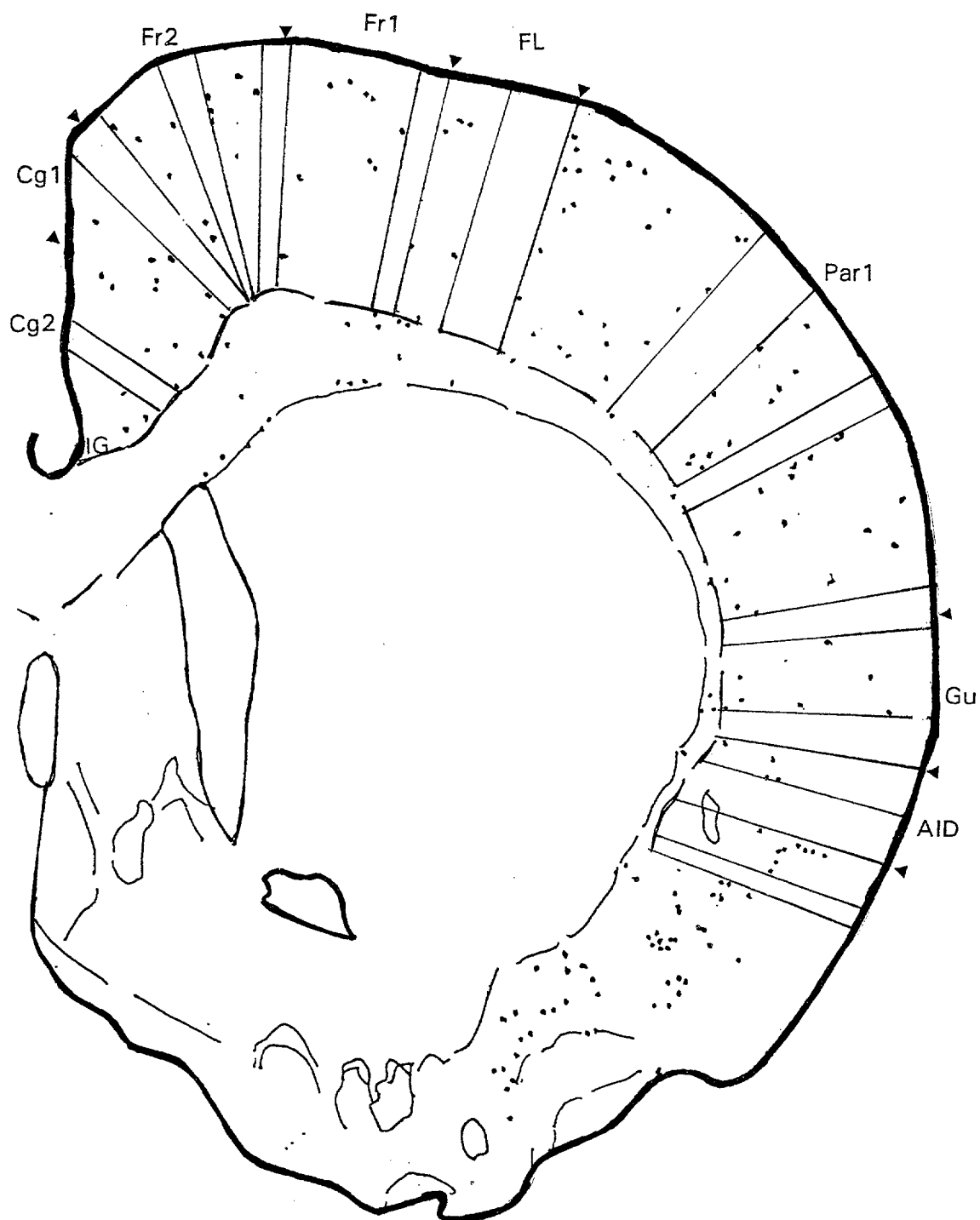


Fig. 185: Animal adulto. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma 0.7 mm. Se observan los espacios sin neuronas marcadas en los límites de las áreas Fr y del área Par.

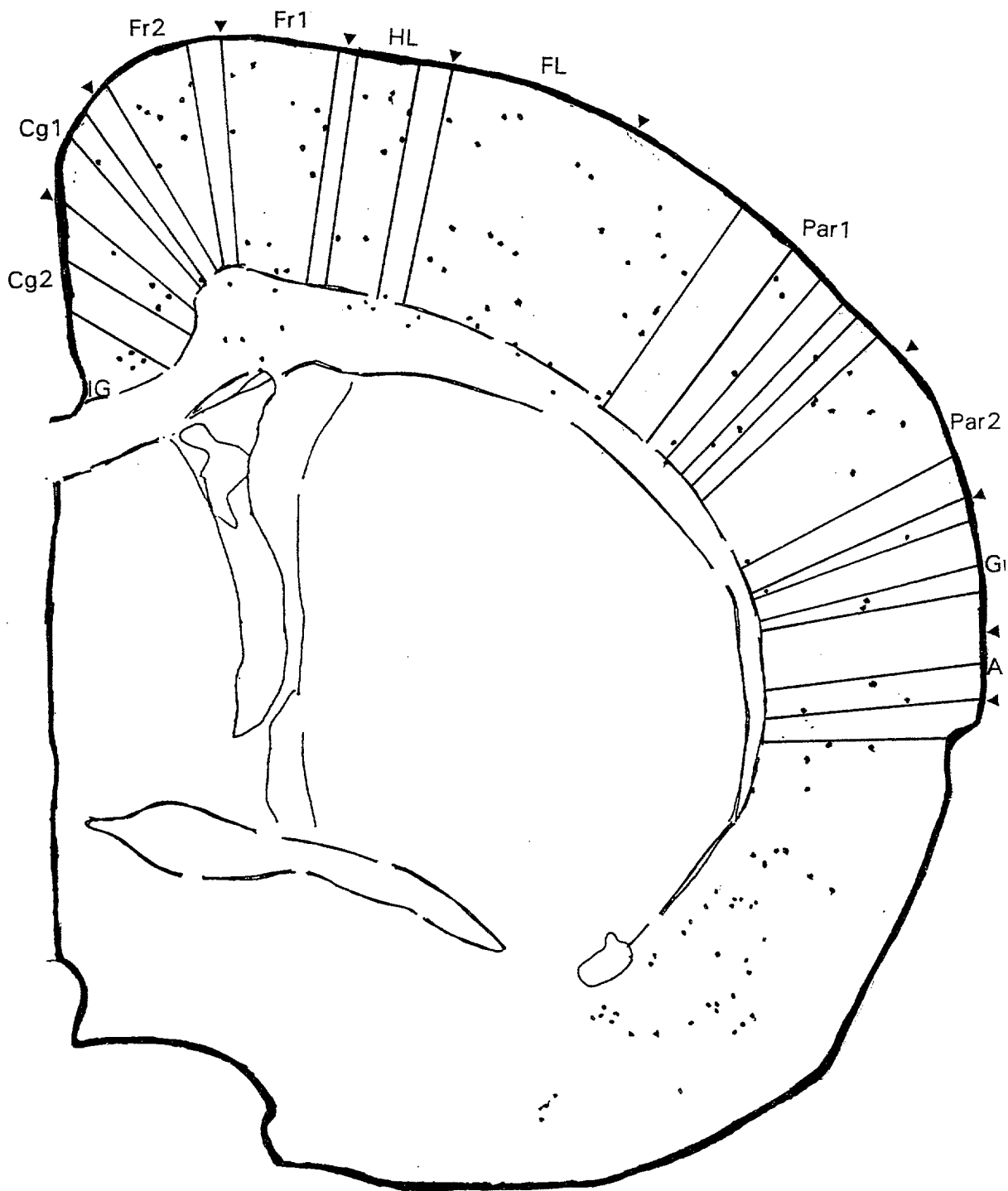


Fig. 186: Animal adulto. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -0.3 mm. Se observan los espacios sin neuronas marcadas en los límites de las áreas Fr, en el área Par y el espacio de AID.

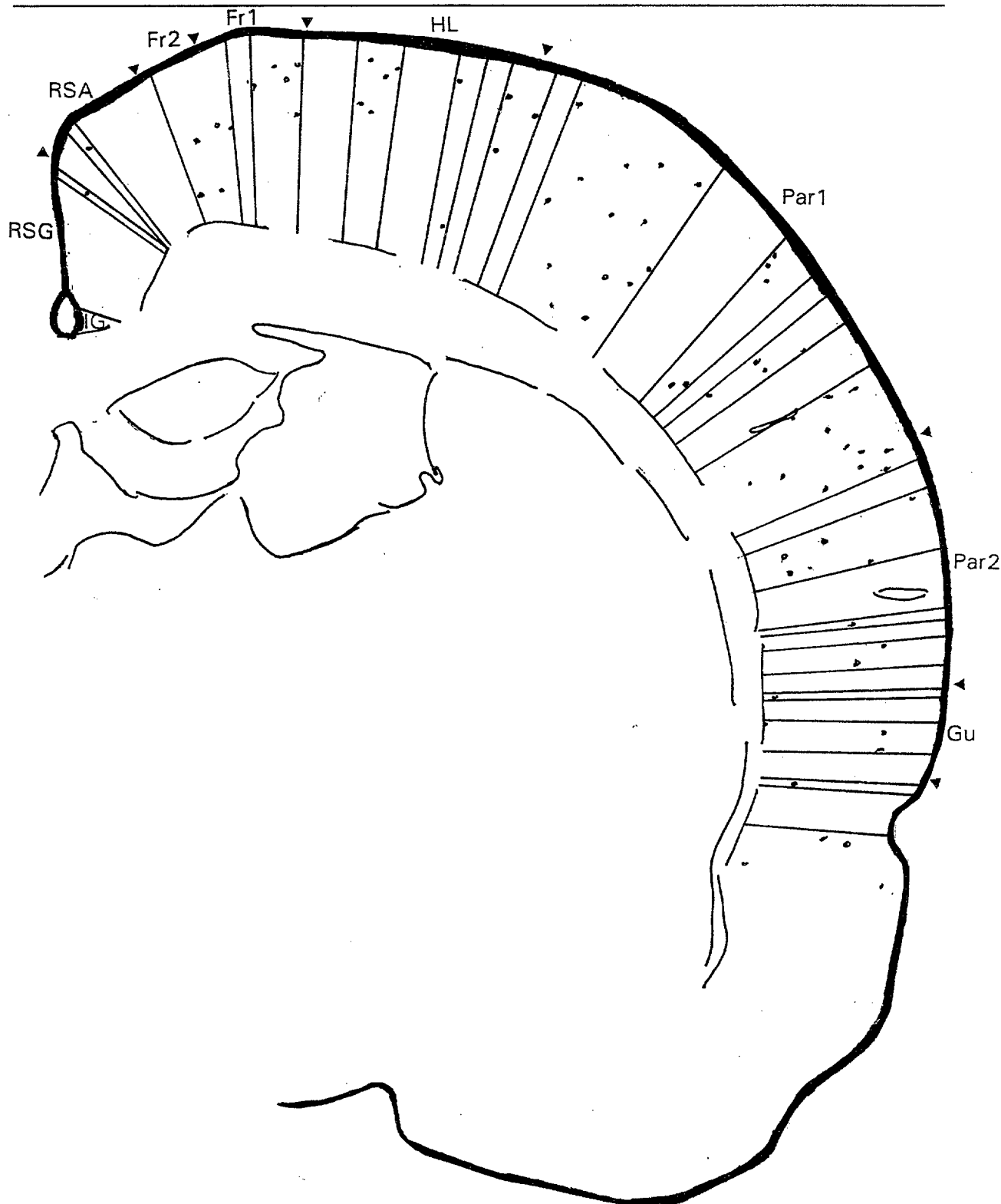


Fig. 187: Animal adulto. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -1.8 mm. Se observan los espacios sin neuronas marcadas del área Par y de la corteza RS.

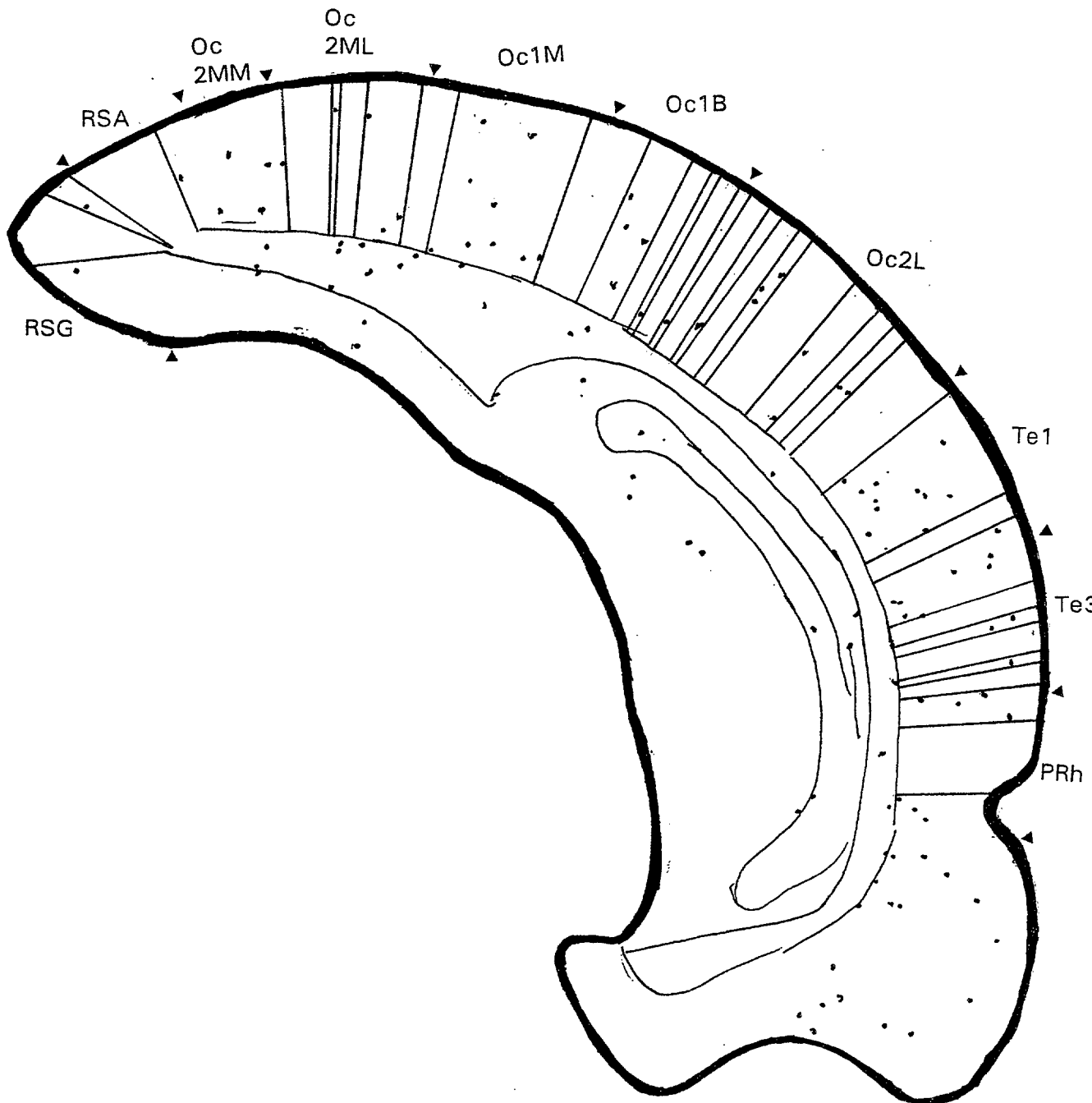


Fig. 188: Animal adulto. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -5.8 mm. Se observan los espacios sin neuronas marcadas de las áreas RS y Oc.

Animales viejos

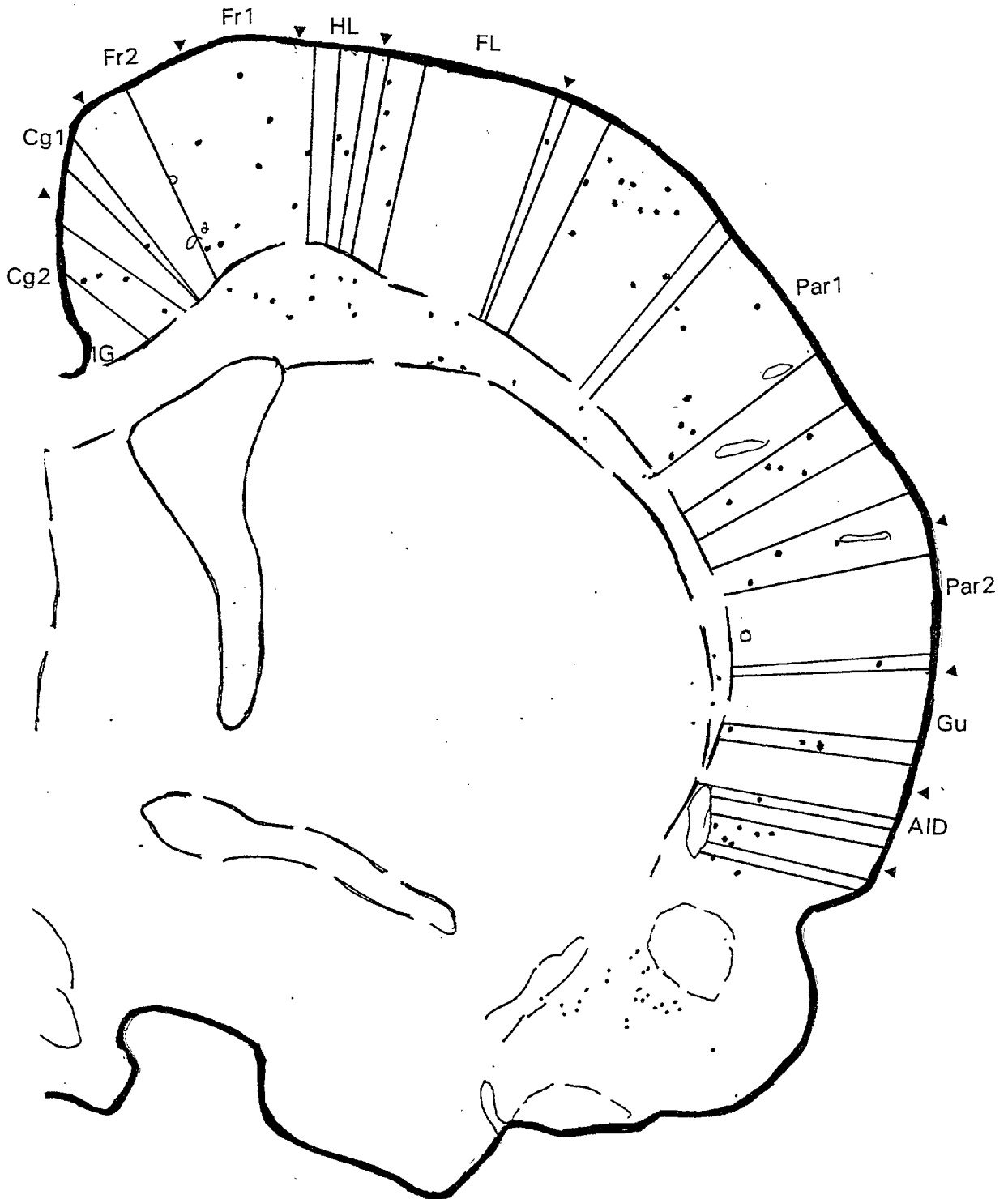


Fig. 189: Animal viejo. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -0.3 mm. Se observa la distribución de los espacios sin neuronas marcadas de las áreas Fr y Par.

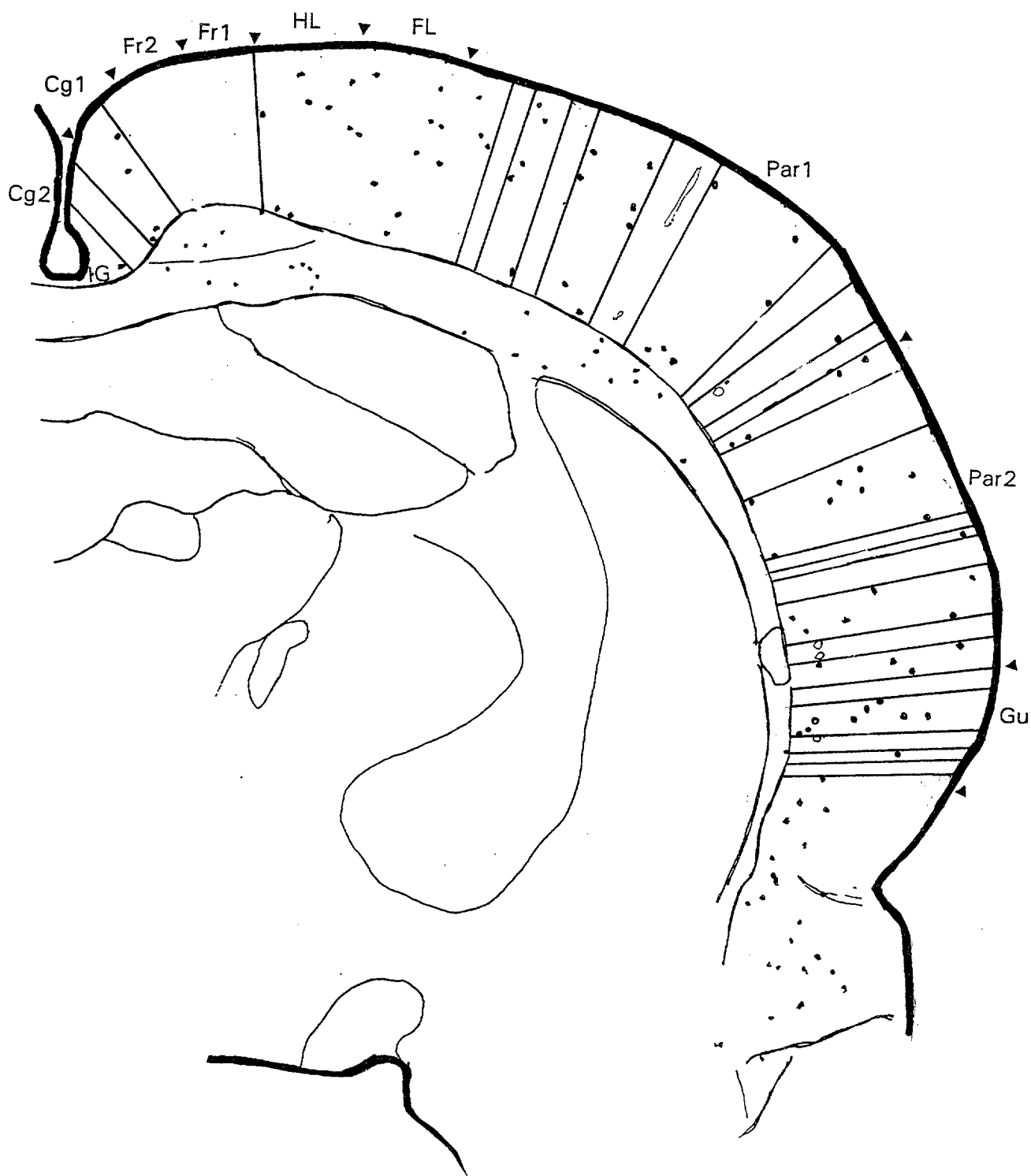


Fig. 190: Animal viejo. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -1.3 mm. Se observa como se distribuyen los espacios sin neuronas marcadas.

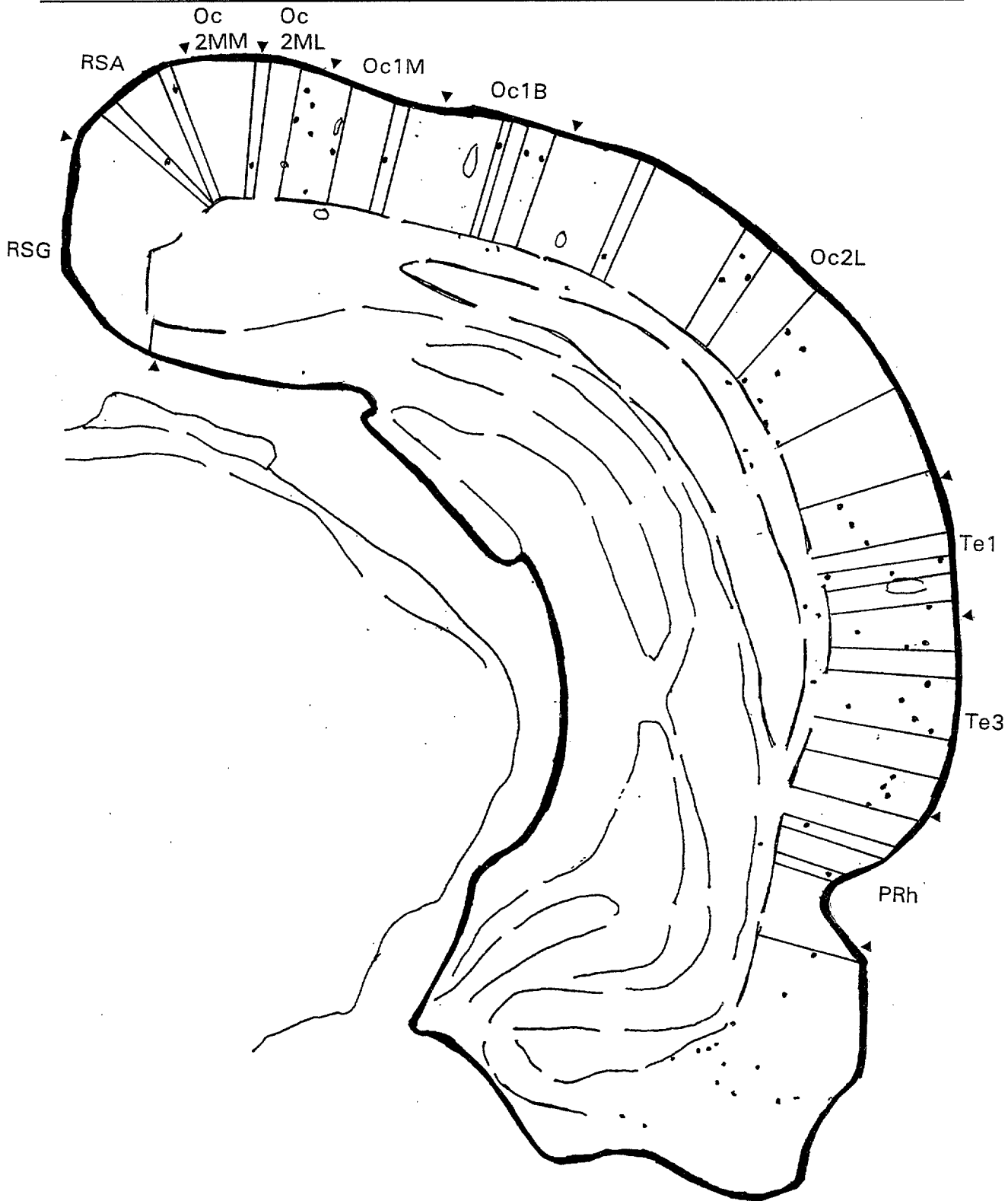


Fig. 191: Animal viejo. Reproducción a cámara clara de un corte realizado aproximadamente a nivel de Bregma -5.8 mm. Se observan los espacios sin neuronas marcadas de la corteza occipital.

Neuronas y vasos

Animales adultos



Fig. 192: Neurona bipeñachada adosada a un vaso. Orientación vertical. Área Par. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehído.

Fig. 193: Neurona bipeñachada adosada a un vaso sanguíneo. Orientación vertical. Área Te₁. Capa III. Animal adulto. Paraformaldehído.



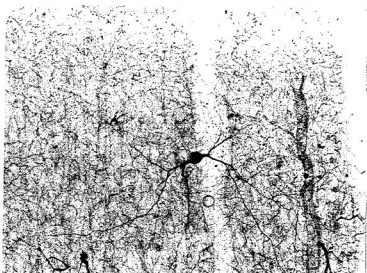


Fig. 194 : Neurona bipoachada. Cuerpo globoso y árbol dendrítico en relación con un vaso. Orientación horizontal. Área HL/Par. Capa II/III. Animal adulto. Paraformaldehido.

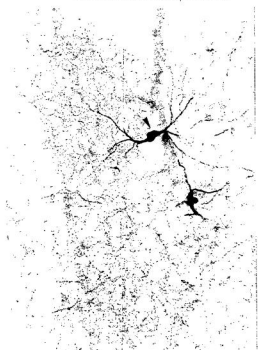
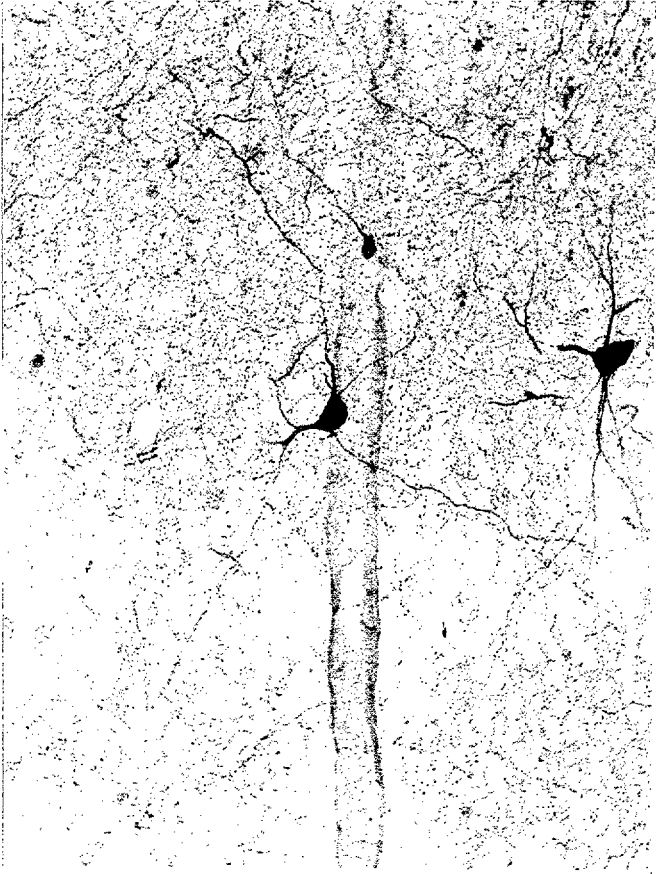


Fig. 195: Neurona bipoachada. Cuerpo irregular. Árbol dendrítico relacionado con el vaso. Orientación horizontal. Área Par/Te. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 196: Neurona multipolar. Cuerpo irregular adosado a un vaso. Orientación vertical. Área Oc₁. Capa II/III. Animal adulto. Paraformaldehído.



Fig. 197: Neurona multipolar. Cuerpo en media luna en relación con un vaso sanguíneo. Área límite Cg₁-Cg₂. Capa II/IV. Animal adulto. Paraformaldehído.



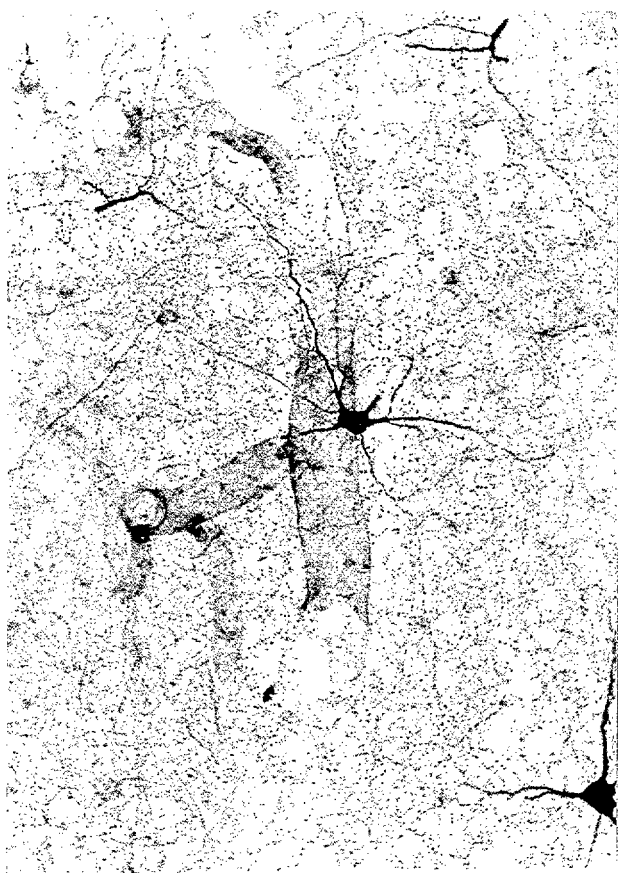
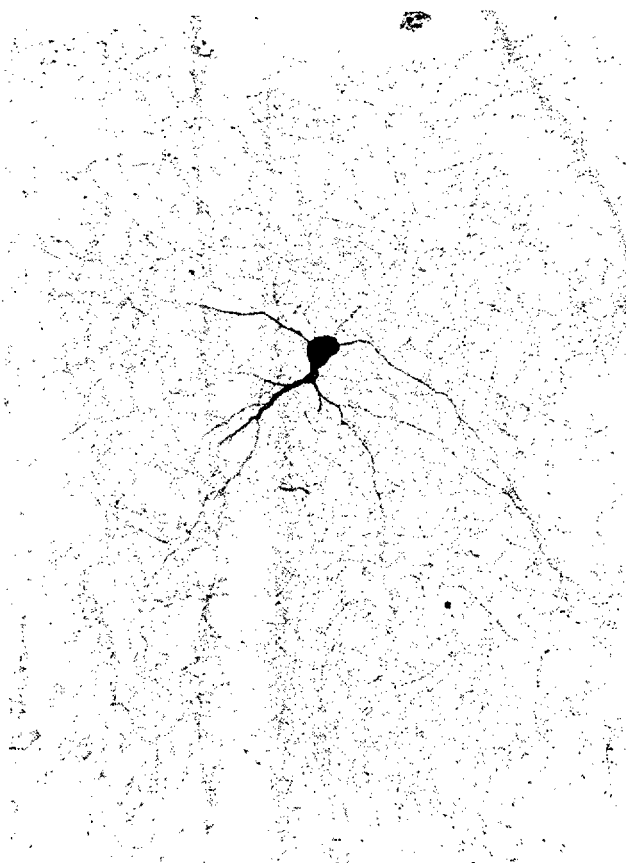


Fig. 198: Neurona multipolar. Cuerpo poligonal relacionado con un vaso. Área Par. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 199: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Árbol dendrítico relacionado con un vaso. Área Par₁. Capa II/III. Animal adulto. Paraformaldehido.



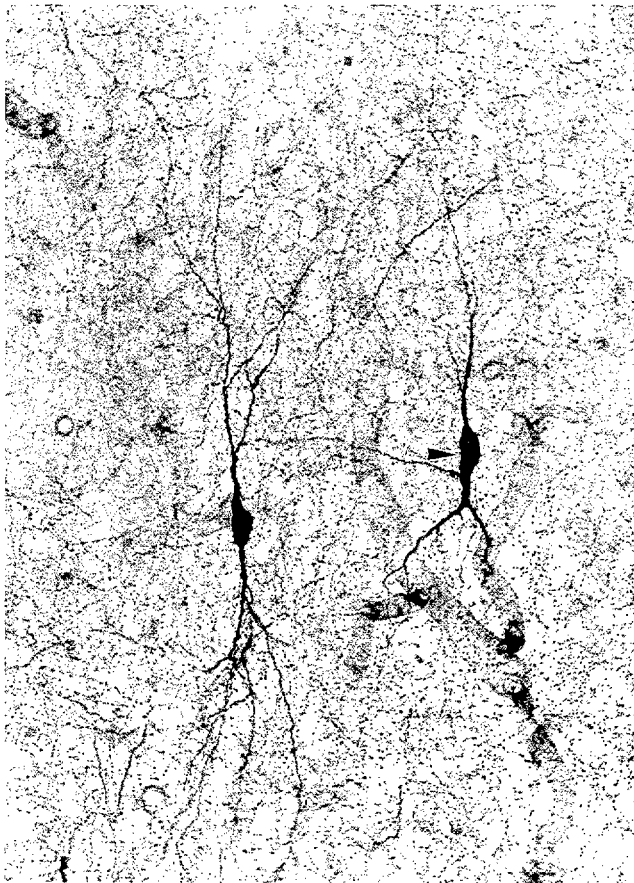
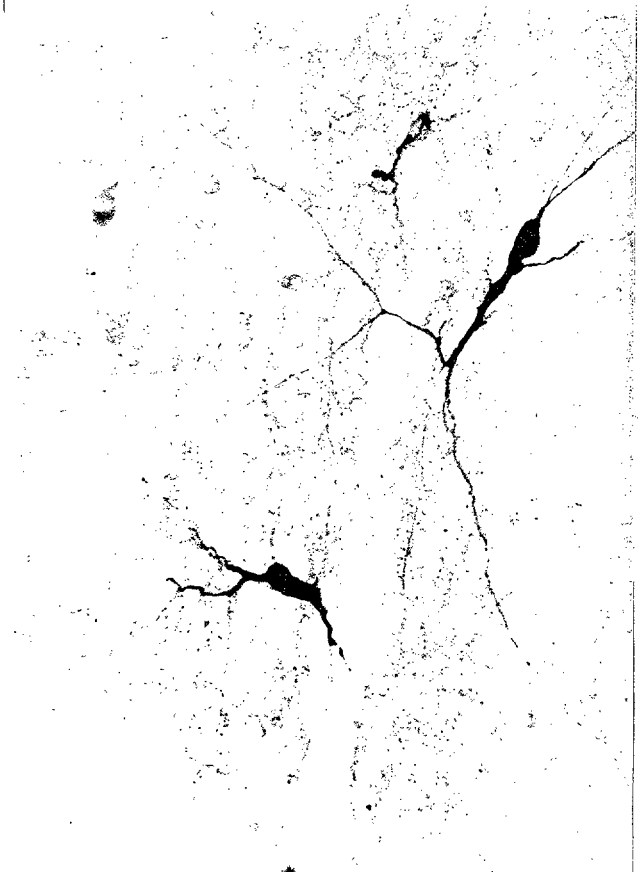


Fig. 200: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme. Árbol dendrítico relacionado con la ramificación vascular. Área Par. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 201: Neuronas atípicas. Cuerpos irregulares y alargados. Orientación vertical y horizontal. Árboles dendríticos relacionados con un vaso. Área Par₂. Capa III/IV. Animal adulto. Paraformaldehido.



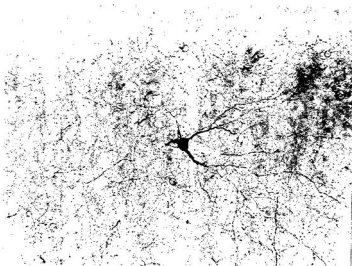


Fig. 202: Neurona multipolar en T. Cuerpo triangular-globoso, relacionado con un vaso. Área Gu. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

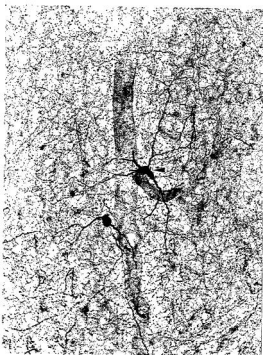


Fig. 203: Neurona multipolar. Cuerpo adaptado a la bifurcación vascular. Área Cg₂. Capa IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

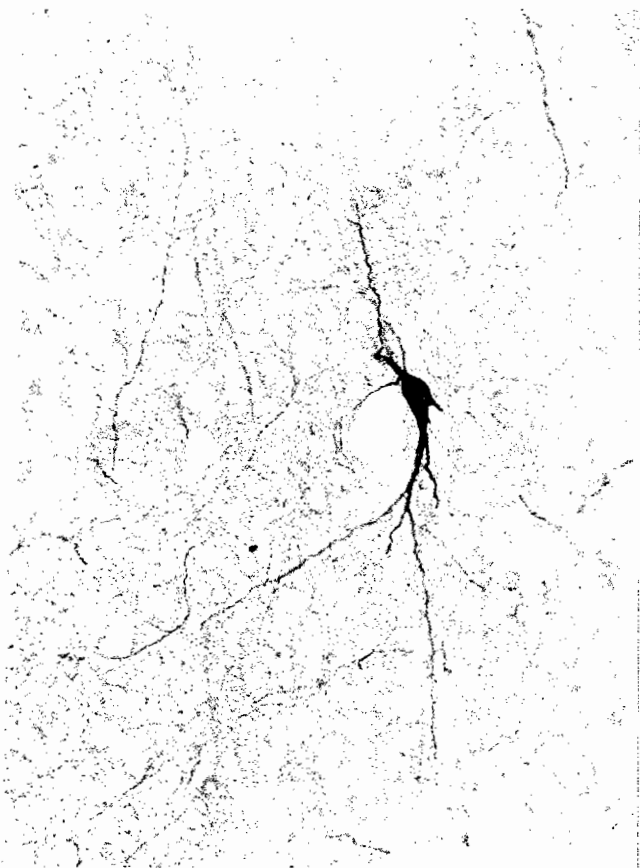


Fig. 204: Neurona bipeachada de cuerpo fusiforme adaptado a un vaso. Área Par. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 205: Neurona bipolar. Cuerpo fusiforme e irregular. Orientación vertical. Ramificaciones dendríticas relacionadas con una bifurcación vascular. Área Par. Capa V. Animal adulto. Paraformaldehido.

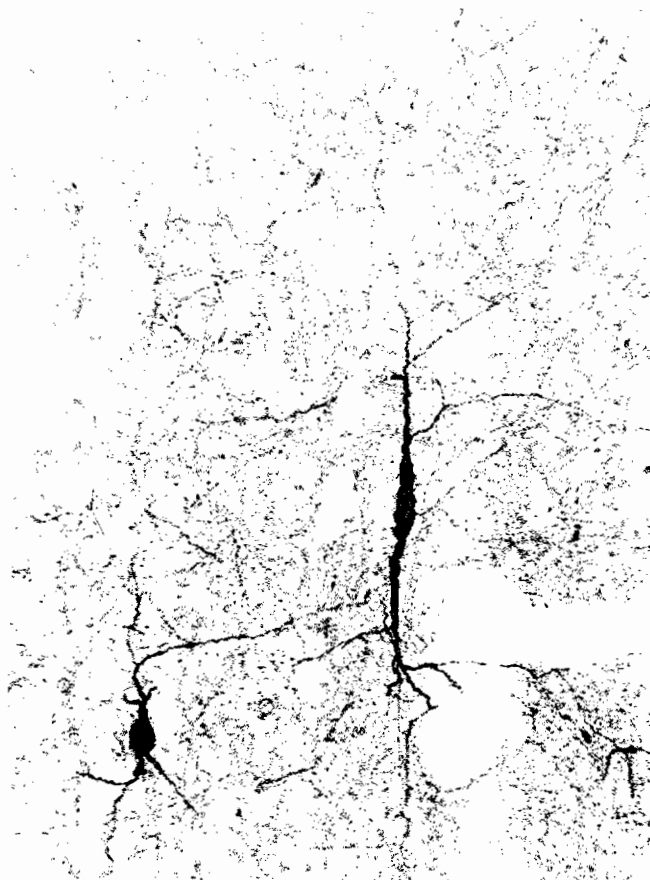
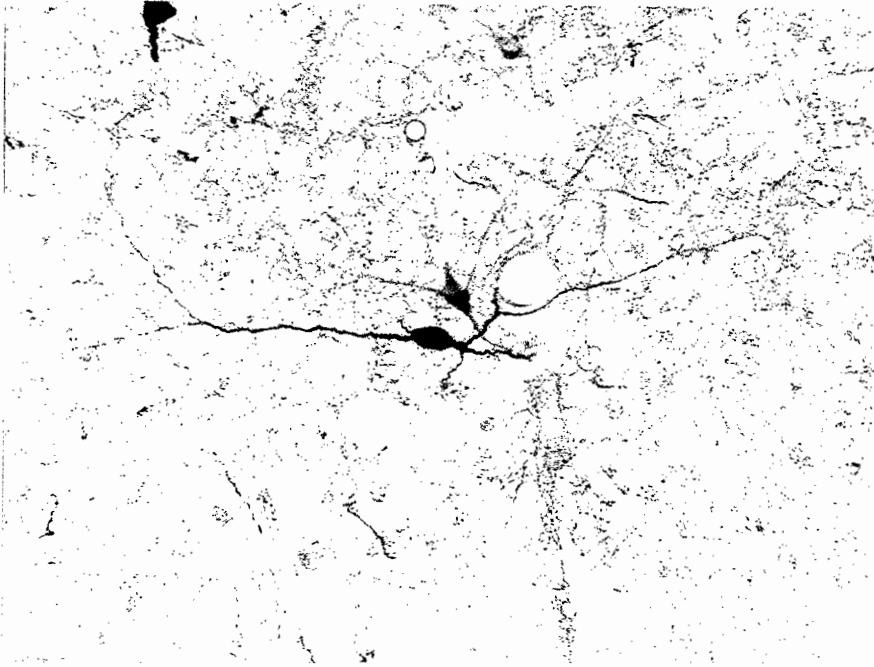


Fig. 206: Neurona bipolar con una ramificación dendrítica que abraza un vaso vecino. Area Te. Capas V-VI. Animal adulto. Paraformaldehído.



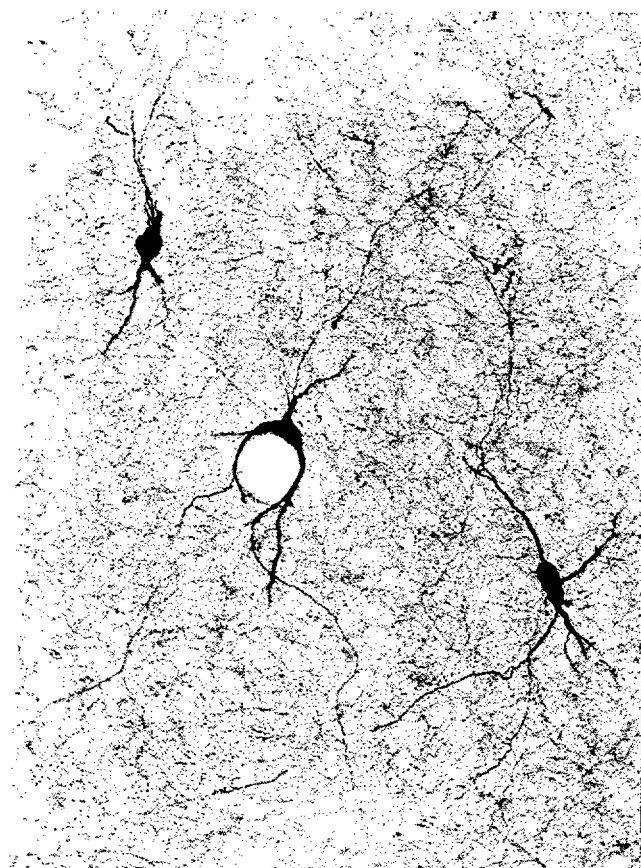
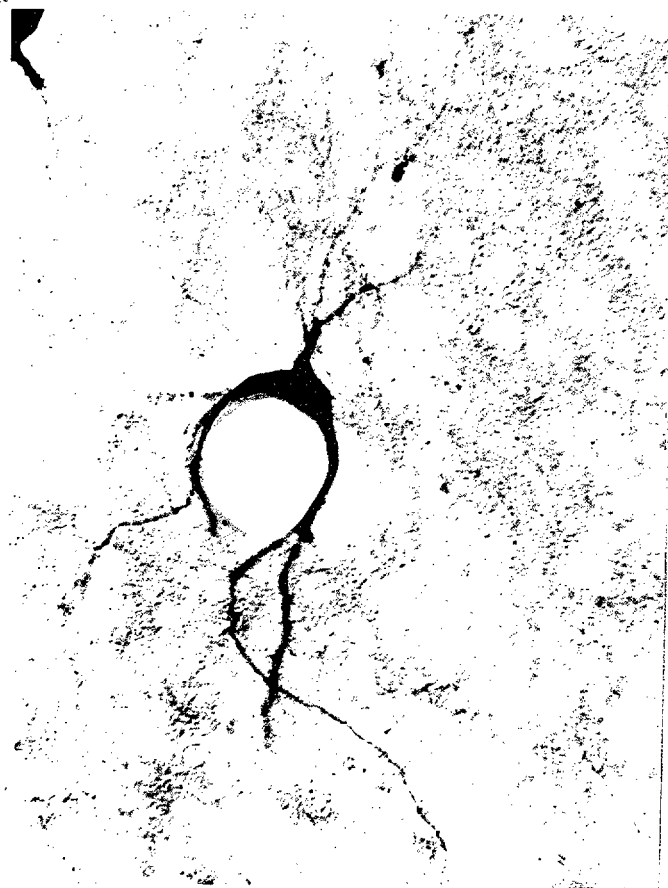


Fig. 207: Neurona multipolar que deforma su cuerpo para abrazar al vaso sanguíneo. Capa VI. Área Gu. Animal adulto. Paraformaldehido.

Fig. 208: Detalle de la neurona descrita en la figura anterior. Las dendritas rodean al vaso sanguíneo.



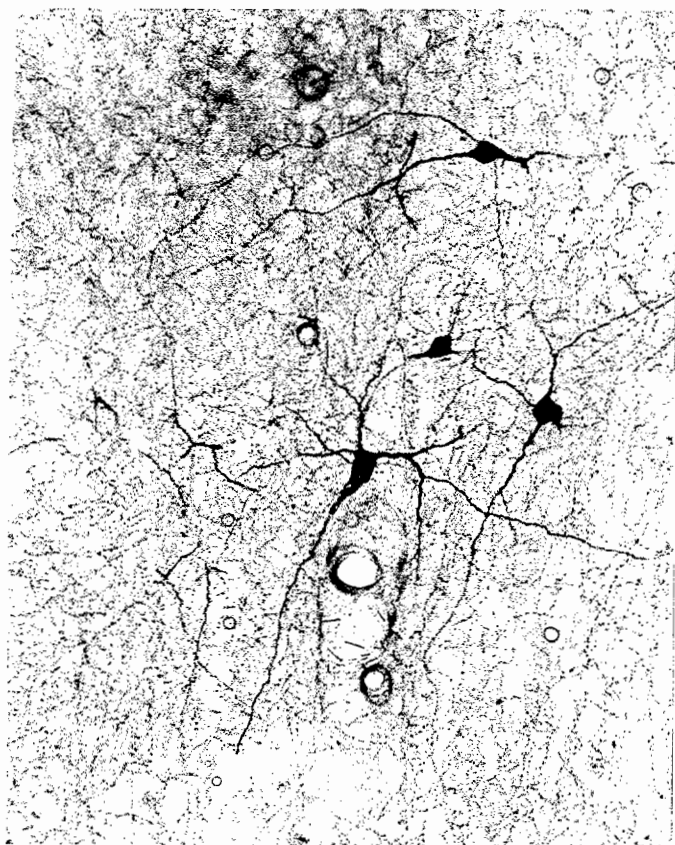


Fig. 209: Grupo de pequeñas neuronas relacionadas con un vaso sanguíneo y con sus ramificaciones. Área Oc_{2M}. Capas II-IV. Animal adulto. Paraformaldehido.

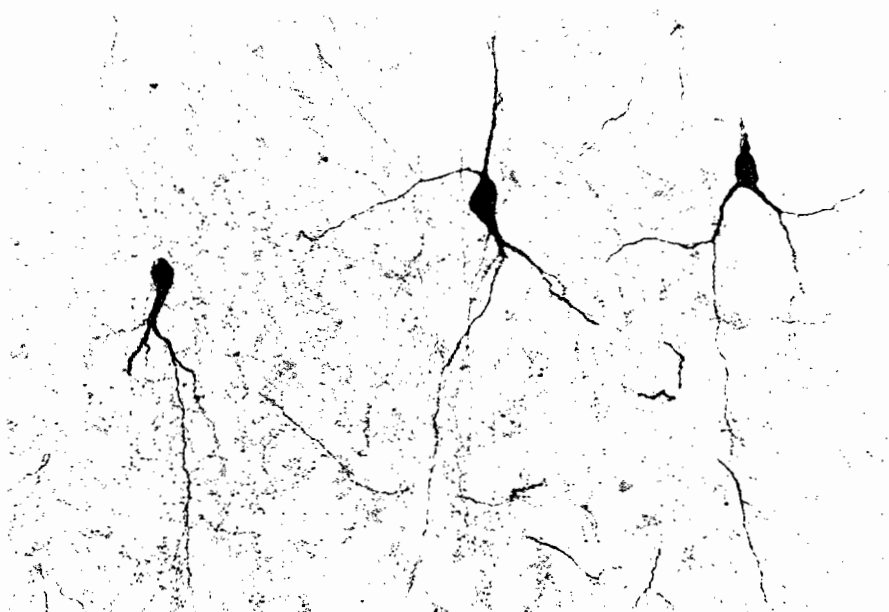


Fig. 210: Grupo horizontal de neuronas relacionadas con un vaso. Área Fr. Capa II. Animal adulto. Paraformaldehido.

Animales viejos

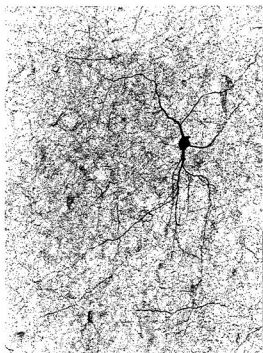


Fig. 211: Neurona multipolar. Cuerpo globoso. Ramificaciones que siguen el curso de un vaso sanguíneo y se abrazan a sus ramificaciones. Área Par. Capa IV. Animal viejo. Paraformaldehido.

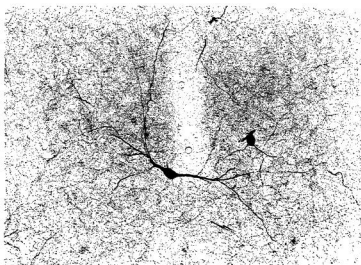


Fig. 212: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme adosado al vaso. Orientación horizontal. Área Par. Capa II. Animal viejo. Paraformaldehido.

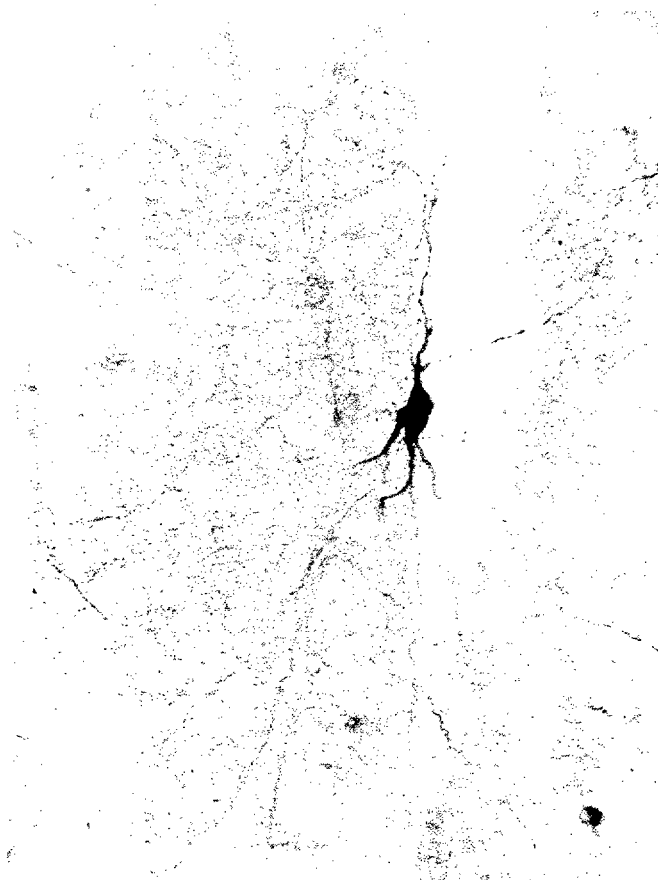


Fig. 213: Neurona bipenachada. Cuerpo fusiforme adaptado al vaso. Ramificaciones que siguen el curso vascular y se abrazan a sus ramificaciones. Área HL/FL. Capa VI. Animal viejo. Paraformaldehido.

Animales jóvenes

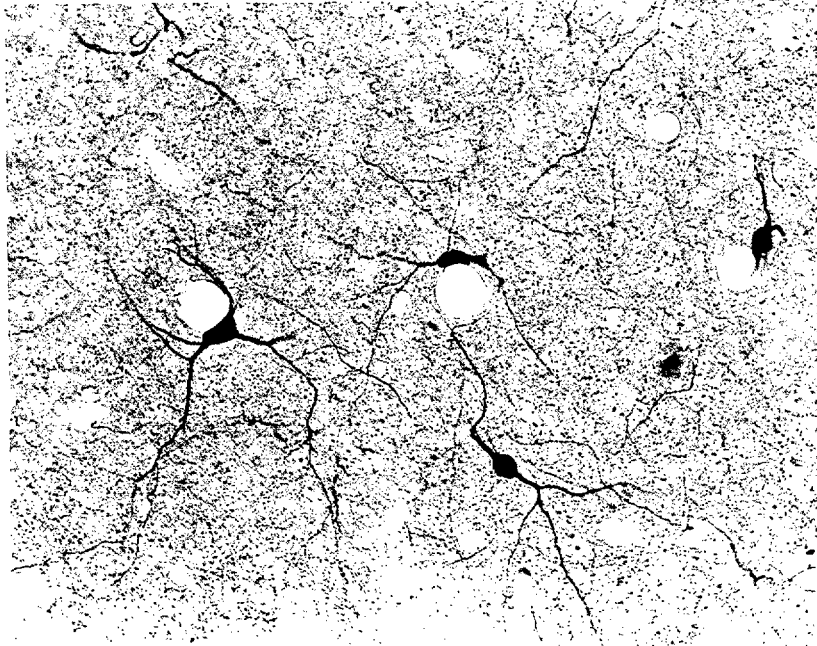


Fig. 214: Neuronas bipenachadas y multipolares relacionadas con un grupo de vasos sanguíneos. Animal joven. Glutaraldehido. Corte horizontal.

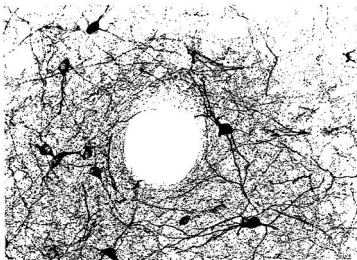


Fig. 215: Grupo de neuronas relacionadas con un vaso de mediano calibre. Animal joven. Glutaraldehído. Corte horizontal.

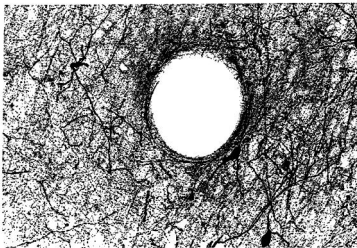


Fig. 216: Grupo de neuronas relacionadas con un vaso de mediano calibre. Animal joven. Glutaraldehído. Corte horizontal.

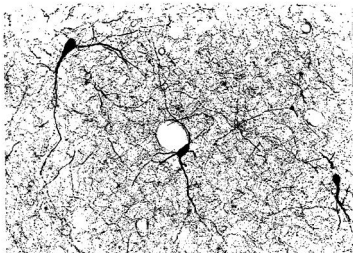


Fig. 217: Neurona multipolar que adapta su cuerpo a un vaso de pequeño calibre. Animal joven. Glutaraldehído. Corte horizontal.

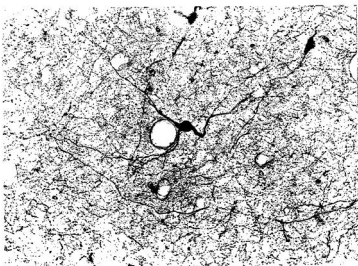


Fig. 218: Neurona bipenachada cuyo árbol dendrítico abraza un vaso de pequeño calibre. Animal joven. Glutaraldehído. Corte horizontal.

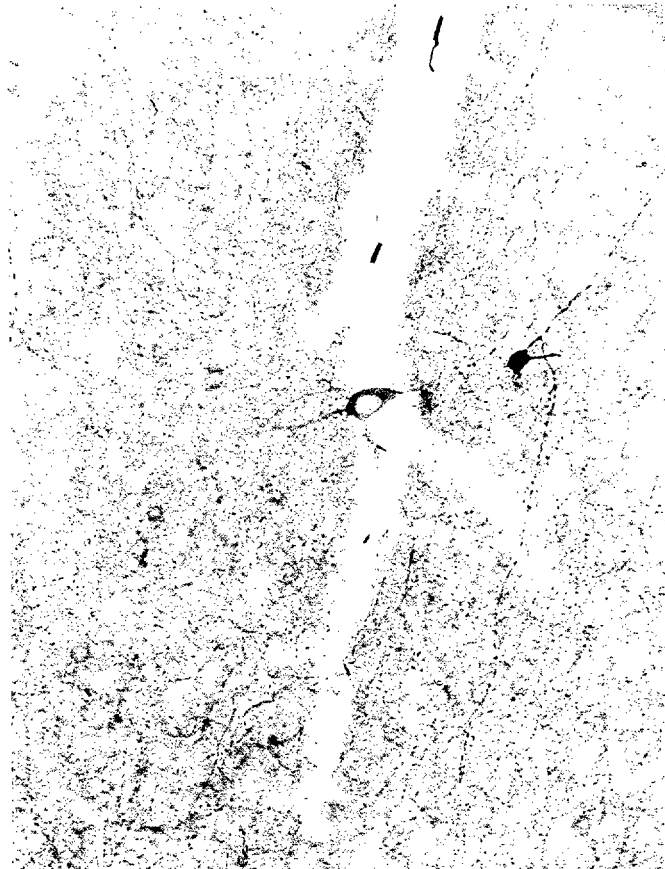


Fig. 219: Neurona multipolar con núcleo claro situada junta a la bifurcación de un vaso. Área HL. Capa V. Animal joven. Glutaraldehido.

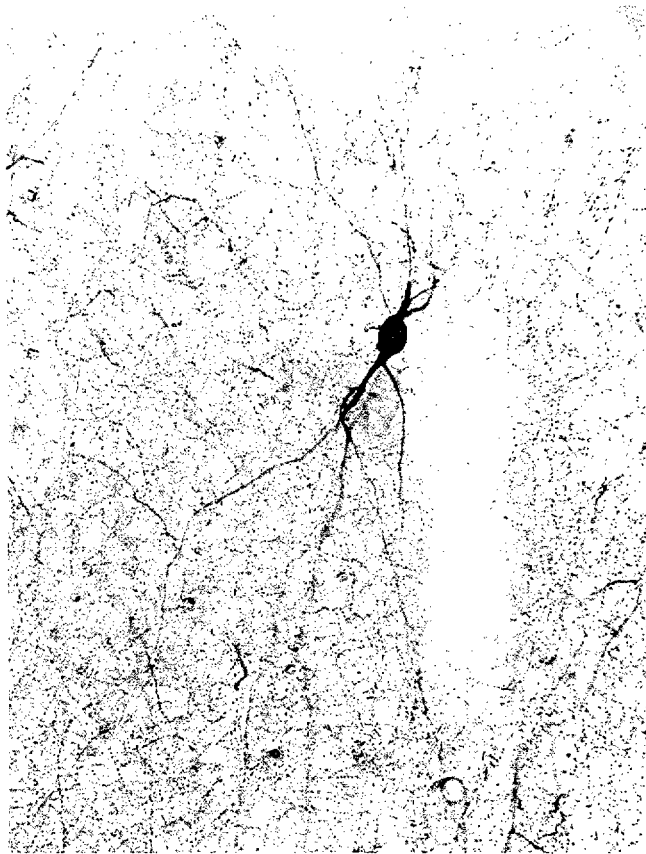
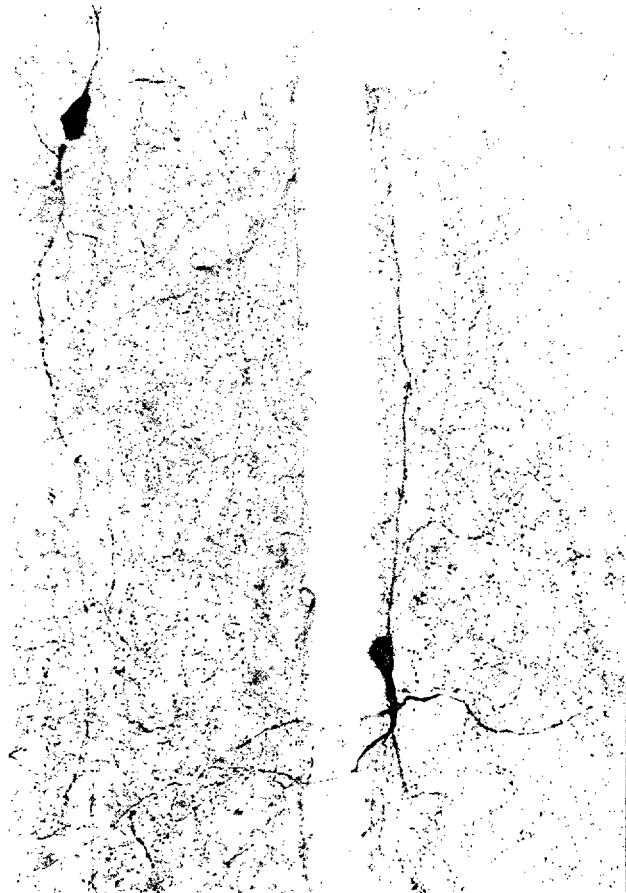


Fig. 220: Neurona bipeachada, cuerpo fusiforme y globoso, relacionada con un vaso. Área Fr. Capa II. Animal joven. Glutaraldehido.

Fig. 221: Neurona bipeachada. Adosada a un vaso; su árbol dendrítico sigue el curso vascular. Área Par. Capa IV-V. Animal joven. Glutaraldehido.



neuronas y vasos

Animales adultos

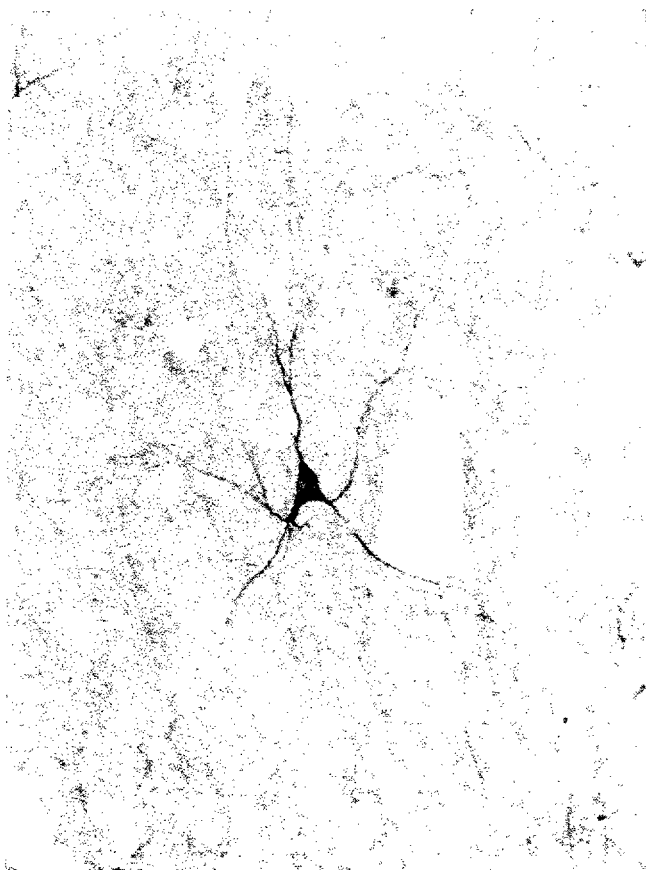


Fig. 222: Neurona piramidal, de mediano tamaño, marcada en su totalidad. Relacionada con un vaso. Área Par. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

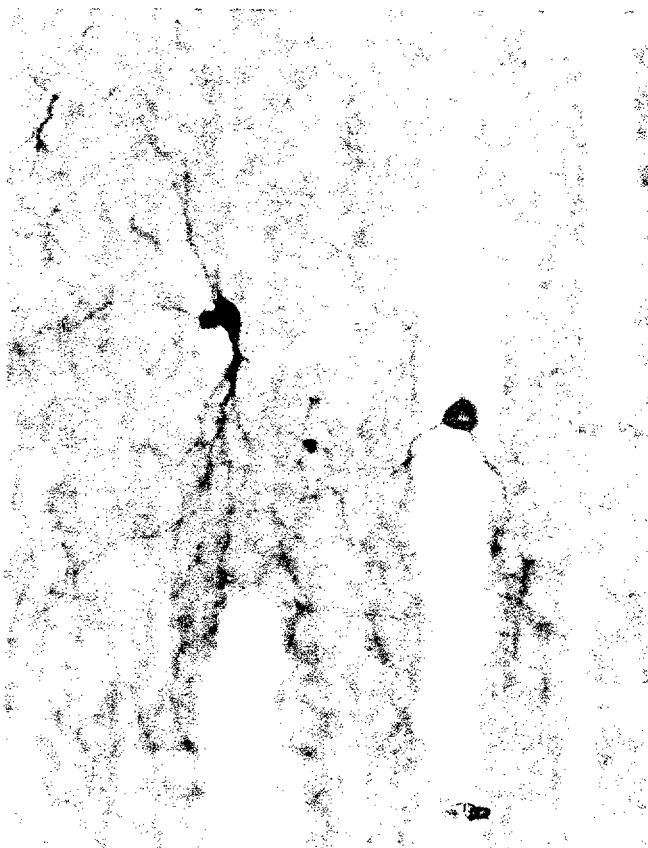


Fig. 223: Neurona bipenachada que adapta su cuerpo a un vaso. Neurona multipolar, de cuerpo globoso, relacionada con otro vaso. Área FL/HL. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

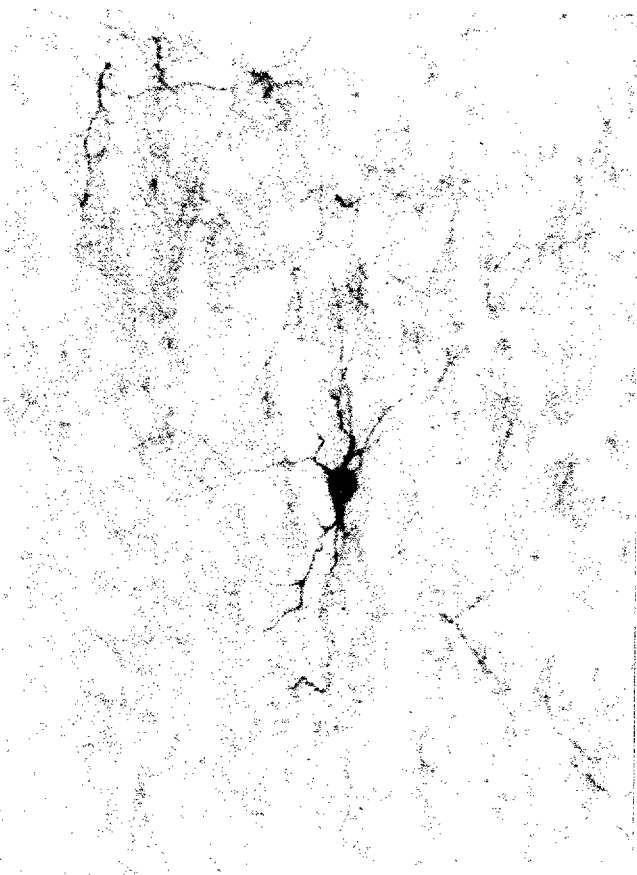


Fig. 224: Neurona bipenachada relacionada con un vaso; su árbol dendrítico sigue el curso vascular. Área Fr. Capa V. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

Fig. 225: Neurona multipolar en T. Relacionada con un vaso. Área HL. Capa III. NOS neuronal. Animal adulto. Inmunohistoquímica.

