

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA**

*Departamento de Cirugía*



***Valoración de las neuronas NADPH-d  
en la Corteza Visual:  
Estudio Experimental en Rata Wistar***

**Tesis Doctoral**

***Presentada por:***

**Lucía Verdejo Gómez**

***Dirigida por:***

**Prof. Dr. Vicente Vila Bou**

**Prof. Dra. Antonia Fons Moreno**

**Valencia 2013**







**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA**

**Departamento de Cirugía**

**Valoración de las neuronas NADPH-d  
en la Corteza Visual:  
Estudio Experimental en Rata Wistar**

***Tesis Doctoral***

**Presentada por:**

**Lucía Verdejo Gómez**

Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia  
Especialista en Oftalmología

**Dirigida por:**

**Prof. Dr. Vicente Vila Bou**

Doctor en Medicina y Cirugía  
Profesor Titular del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y  
Odontología de Valencia  
Especialista en Oftalmología

**Prof. Dra. Antonia Fons Moreno**

Doctora en Medicina y Cirugía  
Profesora Titular de Oftalmología del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y  
Odontología de Valencia  
Especialista en Oftalmología

**Valencia 2013**



**Prof. Dr. Vicente Vila Bou**

Doctor en Medicina y Cirugía  
Profesor Titular del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad  
de Medicina y Odontología de Valencia  
Especialista en Oftalmología

**Prof. Dra. Antonia Fons Moreno**

Doctora en Medicina y Cirugía  
Profesora Titular de Oftalmología del Departamento de Cirugía de la  
Facultad de Medicina y Odontología de Valencia  
Especialista en Oftalmología

**CERTIFICAN QUE:**

La presente Tesis Doctoral titulada **“Valoración de las neuronas NADPH-d en la Corteza Visual: Estudio experimental en rata Wistar”** ha sido llevada a cabo por Dña. Lucía Verdejo Gómez en el laboratorio de oftalmología experimental de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” de Valencia. Que el doctorando ha realizado todos los experimentos incluidos en este trabajo bajo mi supervisión, presentándome el manuscrito definitivo para revisión y aprobación.

Por lo tanto doy mi consentimiento para que la Tesis sea presentada ante los departamentos correspondientes de Tercer Ciclo de la Universidad de Valencia, y que sea defendida ante el tribunal para que **Dña. Lucía Verdejo Gómez** pueda obtener el grado de Doctor.

Para que conste en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente documento

En Valencia, a 24 de Febrero de 2013



***“La educación es el pasaporte para el futuro,  
el mañana pertenece a aquellos  
que se preparan en el presente”***

***Malcolm X***



*A mis padres  
Vicenta y Marcelino  
por darme las oportunidades que ellos nunca tuvieron*

*A Miguel, por estar siempre a mi lado y no dejarme desistir*

*A mi hija Lucía, la alegría de mi vida*



## **Agradecimientos :**

*Este trabajo se lo dedico a mis padres, a Vicenta y Marcelino, por darme las oportunidades en la vida que ellos nunca tuvieron. Por enseñarme a perseguir los sueños y darme la oportunidad de ser la primera licenciada en mi familia. Gracias por vuestra entrega incondicional, sois un ejemplo para mí.*

*Agradecerle al Dr. D. Vicente Vila Bou el haber creído en mí. Vicente, no olvidaré las tardes en el laboratorio cuando no salían las cosas, no olvidaré tu paciencia, tu apoyo y tus ánimos (“la investigación es así, Lucía, pero hay que seguir”). Gracias por tus críticas, aunque siempre duras pero siempre acertadas. Gracias por la ilusión que contagias en todo lo que haces.*

*Agradecerle a la Dra. Dña. Antonia Fons su constante apoyo durante estos años de investigación. Gracias por sus consejos y asesoramiento en este trabajo. Gracias por los ánimos en los momentos más difíciles.*

*Gracias a la Dra. Dña. Rosa Peris, cuyo trabajo de investigación sobre las neuronas NADPH-d significó el germen de la presente Tesis e hizo “que me picara el gusanillo de la investigación”.*

*Gracias a todos los componentes del Servicio de Oftalmología del Hospital Doctor Peset de Valencia, desde el primero hasta el último. Fueron unos años de residencia maravillosos en los que aprendí mucho tanto en lo profesional como en lo humano. Siempre os llevaré en el corazón.*

*Gracias a todos mis compañeros del Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón, por la ilusión de todos en la oftalmología, me siento afortunada de trabajar con vosotros. Gracias en especial a Juan Miguel Esteban, “mi maestro”, gracias por enseñarme tantas cosas cada día, siempre desde la sencillez y la humildad.*

*Gracias a los cirujanos plásticos del Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón (Dr. Aracil, Dr. Barrés y Dr. de Francia), por vuestra infinita paciencia y por todos los buenos momentos que paso con vosotros en quirófano.*

*Gracias a Mireia Sánchez, Amparo Lanáquera y a M. Carmen García Minguillán por la amistad que nos une y por el cariño con el que me habéis ayudado a resolver todos mis problemas informáticos.*

*Gracias a Alfredo, “mi matemático”, por intentar hacerme comprender un lenguaje de números, por hacer las cosas difíciles, fáciles .*

*Gracias a Roberto, Mireia, Paco y Ana, por vuestro apoyo incondicional y por los constantes ánimos durante estos años, formáis parte de mi pequeña familia.*

*Gracias a Ana, Mara, Mati y Raquel, por vuestra valiosa amistad y por enseñarme siempre a ver el vaso medio lleno.*

*Gracias al “Instituto de Biomedicina del Consejo Superior de Investigaciones Científicas” de Valencia que nos han aportado generosamente los animales de experimentación utilizados en este trabajo.*

*Gracias a todos los componentes de la “Unidad de Investigación Oftalmológica Santiago Grisolia” (Carmina, Óscar, Laura, Vicente, Carla, Vicente, Laura y Raúl). Muy en especial a la Dra. Sheila Pons, “mi bióloga”, gracias por tus consejos y enseñarme a manejarme en un laboratorio, gracias por tu amistad, que es lo más valioso que he encontrado en estos años. Gracias en especial también a la Dra. Dña. M. Dolores Pinazo, por tus consejos, por tu lucha por la investigación oftalmológica, mantén siempre esa ilusión.*

*Por último, gracias a mis dos grandes amores, a mi esposo Miguel y a mi hija Lucía.*

*Miguel, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por tu apoyo y por no dejarme desistir nunca en los momentos difíciles.*

*Gracias a mi pequeña hija Lucía, por su alegría constante y por enseñarme qué es lo importante de verdad en la vida.*





# Índice



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>¿QUÉ ES EL ÓXIDO NÍTRICO?</i> .....	3
1.1.1. La Óxido Nítrico Sintasa (NOS):.....	4
1.1.2. ¿Qué función tiene el Óxido Nítrico?.....	8
1.1.3. Óxido Nítrico y Envejecimiento:.....	14
1.1.4. El Óxido Nítrico y los Procesos Patológicos.....	15
1.1.5. Sistema Nervioso Central y Óxido Nítrico .....	18
1.1.5.1. Sistema Nervioso Central y el Sistema Guanilil-ciclasa (GMPC): .....	19
1.2. <i>LA NADPH-diaforasa:</i> .....	21
1.2.1. ¿Qué es la Neurona NADPH-diaforasa? .....	21
1.2.2. Función de las células NADPH-diaforasa y correlación con el Óxido Nítrico...24	
1.2.3. Distribución de las células NADPH-diaforasa: .....	26
1.3. <i>RECUERDO ANATÓMICO EN HUMANOS</i> .....	27
1.3.1. Corteza Visual Primaria (Área cerebral 17) .....	27
1.4. <i>RATA WÍSTAR COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</i> .....	36
1.4.1. Anatomía comparada .....	40
1.5. <i>ACTUALIZACIÓN DEL TEMA</i> .....	41
1.5.1. Actualización a nivel experimental con animales .....	41
1.5.1.1. NADPH-d en la Retina .....	41
1.5.1.2. NADPH-d en el Nervio Óptico .....	45
1.5.1.3. NADPH-d en el Ganglio Geniculado Lateral .....	52
1.5.1.4. NADPH-d y Sistema Nervioso Central .....	53
1.5.2. Actualización experimental en primates y en humanos (consideraciones de aplicación clínica).....	61
1.5.2.1. NADPH-d en Retina y Nervio Óptico .....	61
1.5.2.2. NADPH-d y Sistema Nervioso Central .....	64
<b>2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>69</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN .....	71

2.2. HIPÓTESIS.....	71
2.3. OBJETIVOS.....	77
<b>3. MATERIAL Y METODOLOGÍA .....</b>	<b>79</b>
3.1. MATERIAL .....	81
3.1.1. SELECCIÓN DE RATAS WÍSTAR .....	81
3.1.1.1. Ratas de una semana de vida.....	84
3.1.1.2. Ratas de tres meses de vida:.....	85
3.1.1.3. Ratas de un año de vida:.....	86
3.2. METODOLOGÍA.....	95
3.2.1. TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOQUÍMICA.....	95
3.2.1.1. Técnica histoquímica para optimizar la localización del área visual primaria en el cerebro de la rata Wistar: Tinción de Nissl .....	95
3.2.1.2. Técnica histoquímica para optimizar la localización de las células NADPH- diaforasa a estudio: Tinción de la NADPH-diaforasa.....	98
3.2.2. OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES .....	102
3.2.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.....	107
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>115</b>
<i>Breve introducción a los resultados generales del estudio.....</i>	<i>117</i>
4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA ESTADIO DE EDAD .....	125
4.1.1. Resultados en ratas Wistar de una semana de vida o T1:.....	125
4.1.2. Resultados en ratas Wistar de tres meses de vida o T2:.....	142
4.1.3. Resultados en ratas Wistar de un año de vida o T3:.....	154
4.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL RECUENTO DE NEURONAS Y AXONES EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD.....	168
4.2.1. Recuento general de neuronas en los tres estadios de edad: .....	168
4.2.2. Recuento de neuronas según la orientación horizontal o vertical por capas de la corteza visual en los tres estadios de edad:.....	175
4.2.3. Recuento general de axones en los tres estadios de edad: .....	187

4.2.4. Recuento de axones según la orientación horizontal o vertical por capas de la corteza visual en los tres estadios de edad:.....	193
<b>4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS CAMBIOS EN LAS NEURONAS NADPH-D EN LAS CAPAS DE LA CORTEZA VISUAL DE LA RATA WÍSTAR EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD.....</b>	<b>202</b>
4.3.1. Neuronas horizontales.....	204
4.3.2. Neuronas verticales.....	207
4.3.3. Estudio Global Neuronal según su orientación.....	210
<b>4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS CAMBIOS EN LOS AXONES NADPH-D EN LAS CAPAS DE LA CORTEZA VISUAL DE LA RATA WÍSTAR EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD.....</b>	<b>213</b>
4.4.1. Axones horizontales.....	214
4.4.2. Axones verticales.....	216
4.4.3. Estudio global axonal según su orientación.....	218
<b>4.5. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE NEURONAS NADPH-D EN NUESTRO ESTUDIO.....</b>	<b>219</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>225</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>241</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>245</b>



# Abreviaturas

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FMN: Flavina mononucleótido

GCs: Guanilil ciclasa

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

L-NAME: N(varpi)-nitro-l-arginina metil ester

NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NADPH-d: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-diaforasa

NMDA: N-metil-D-aspartato

NOS: Óxido nítrico sintasa

SNC: Sistema Nervioso Central

T1: Rata albina Wistar de una semana de vida

T2: Rata albina Wistar de tres meses de vida

T3: Rata albina Wistar de un año de vida

V1: Corteza Visual Primaria ó Área 17 de Brodmann

V2: Corteza Visual Secundaria ó Área 18 de Brodmann

V3 y V4: Corteza Visual Asociativa ó Área 19 de Brodmann



# **1. Introducción**



## **1.1. ¿QUÉ ES EL ÓXIDO NÍTRICO?**

El **óxido nítrico** es un gas que es sintetizado en distintas células del organismo y que tiene un papel crucial como molécula de señalización celular. Los sistemas de transducción de señales en los que interviene el óxido nítrico son especialmente relevantes en el cerebro y en el sistema cardiovascular. Dicha molécula ha sido estudiada desde hace años, en 1987 se descubrió que el cuerpo humano produce pequeñas cantidades de óxido nítrico a partir del aminoácido arginina. Este descubrimiento ayudó a entender el mecanismo de actuación de diversos nitratos orgánicos empleados como medicamentos en ataques de “angor pectoris” que igualmente liberan óxido nítrico en el cuerpo humano. Incluso, el tratamiento de pacientes con arterosclerosis con arginina, parece tener el mismo principio. Por todos estos estudios, en 1998, obtuvieron el Premio Nobel Robert Furchgott, Ferit Murad y Lois Ignarro.

En cuanto a sus características, el óxido nítrico es una molécula gaseosa liposoluble, membrana-penetrante y muy difusible. Se libera aparentemente por difusión sobre células vecinas siendo capaz de activar cadenas metabólicas intracelulares, mediante la síntesis de guanosina 5 monofosfato, el GMPc (que actúa como mensajero intracelular). En referencia a su distribución, el óxido nítrico es una molécula ampliamente distribuida por nuestro organismo. La síntesis de óxido nítrico se realiza por acción de una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS). Por esta síntesis se pueden estudiar

sus variantes o isoformas en macrófagos, células endoteliales y células neuronales.

### **1.1.1. La Óxido Nítrico Sintasa (NOS):**

Como hemos comentado previamente, la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) es la enzima encargada de sintetizar óxido nítrico a partir del aminoácido L-arginina. Para ello, requiere la presencia de dos cofactores, **el oxígeno** y el **Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida (NADPH)**. La enzima NOS se encuentra distribuida en diferentes tejidos del organismo y tiene varias isoformas (*Werner-Felmayer*, 1991). La isoforma NOS-neuronal es la que se encuentra relacionada con la NADPH-d y está ampliamente distribuida por el Sistema Nervioso Central (SNC) (*Saffrey MJ* 1992; *Schmidt*, 1992). Dicha enzima fue caracterizada por *Kuonen y cols.* en 1988; tiene una masa molecular de 150.000-170.000 Daltons con una actividad máxima a 37°C y un amplio rango de pH, con valores óptimos entre 7 y 9 (inhibiéndose sólo, con valores por debajo de 3 y por encima de 11).

Por otro lado, se ha demostrado que existen tres **isoformas** distintas de esta enzima: NOS-**endotelial**, NOS-**neuronal** y NOS-**inducible (ó macrofágica)** (*Hope*, 1991), lo que indica que esta enzima está presente en muy diversas poblaciones celulares como el cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado, córtex, hipotálamo, cerebro medio y médula espinal, apareciendo además en células endoteliales, astrocitos, células Kupfer, fibroblastos, células mesangiales, músculo liso, neutrófilos y macrófagos.

Estas tres isoformas tienen diferentes características:

- **NOS-Neuronal:** Existe una NOS-neuronal de acción rápida, Calcio-calmodulín-dependiente, pero no se descarta que haya otras isoenzimas.
- **NOS-Endotelial:** también Calcio-calmodulín-dependiente.
- **NOS-Inducible-Macrófagica:** los macrófagos no contienen normalmente dicha enzima en su citoplasma sino que se sintetiza “*de novo*” ante la aparición de determinados agentes agresores.

En la actualidad es posible detectar indirectamente la presencia de **NOS-neuronal** mediante dos tipos de procesos:

**Anticuerpos específicos contra la NOS-neuronal purificada** (**Bredt y cols.**, 1992). Cabe decir también que existen comercializados anticuerpos específicos para las otras dos isoformas.

**Detección mediante técnica histoquímica de la actividad de la NADPH-diaforasa** (**Vincent SR y cols.**, 1992).

La isoforma NOS-neuronal fue localizada inmunocitoquímicamente en diversas poblaciones neuronales del cerebro de la rata y en neuronas distribuidas en diversos órganos de rata, mono y humano. Se conoce su amplia distribución en el cerebro de la rata y su correlación con estructuras celulares que contengan GMPc. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se ha estudiado la evolución y la localización de este enzima a nivel de cerebro de

ratas; pudiéndose comprobar que la primera actividad de la enzima NOS en el cerebro de la rata comienza en el día 15 de vida embrionaria desarrollándose ésta durante el periodo prenatal y perinatal (**Terada y cols.**, 1996). Además, en cerebros de ratas adultas se ha podido comprobar que las neuronas Óxido Nítrico Sintasa Inmunoreactivas contienen *varios neurotransmisores* (*Somatostatina, neuropéptido Y, etc.*) de manera que probablemente contribuirían en la **regulación de sistemas de neurotransmisores** (**Bredt y cols.**, 1990).

En cuanto a su distribución, existe una distribución distinta de la enzima a nivel regional, de manera que, los niveles más altos de dicha enzima se encuentran a nivel de **cerebelo**, siendo en el hipotálamo, cuerpo estriado e hipocampo donde se encuentra en niveles inferiores. Por último, los niveles más bajos se dan en el troncoencéfalo (**Förstermann y cols.**, 1999).

La actividad de la NOS **neuronal** depende mucho de la concentración de **ion calcio**. La enzima se encuentra inactiva a bajas concentraciones de ion calcio libre y se activa al máximo cuando estos niveles están alrededor de 1microM (**Mayer y cols.**, 1990). Según estudios realizados por **Rodrigo y cols.** en 1998, el **glutamato** es un aminoácido que tras su eliminación en el terminal presináptico incrementa el flujo del ion calcio hacia el interior de la neurona, el cual activa a la NOS. El glutamato actuaría en este caso sobre el receptor específico para activar este sistema, un subtipo de **N-metil-D-aspartato** (NMDA), concretamente el **NMDA R1**. Por tanto, se ha

demostrado que a nivel del SNC, **las células que presentan actividad de síntesis de óxido nítrico también presentan dicho receptor.**

Por otra parte, se ha podido comprobar que la **NADPH-diaforasa y la NOS se han localizado en las mismas poblaciones neuronales** y que su actividad es paralela a la producción de óxido nítrico y GMPc. La identificación de la NOS como la enzima responsable de la reacción histoquímica de la NADPH-diaforasa, ha hecho posible hacer un detallado mapa de esta enzima a través del SNC. La enzima tiene una semejanza con el citocromo P-450 y contiene secuencias para la unión del flavin-mononucleótido (FMN), del flavin-dinucleótido (FAD) y la NADPH (**Bredt y cols.**, 1991).

### 1.1.2. ¿Qué función tiene el Óxido Nítrico?

En cuanto a su funcionalidad, el óxido nítrico puede estar implicado en una amplia gama de procesos biológicos. El óxido nítrico participa tanto en procesos de **neuromodulación** como en la **regulación vascular**. La salida de óxido nítrico comienza con una mayor concentración de calcio intracelular siendo las proteínas calcio-dependientes las que juegan un importante papel en la regulación del mismo y en la protección de la muerte celular por toxicidad (*Park y cols.*, 1999 y 2000).

Por un lado, el óxido nítrico actúa en ocasiones como un **neurotransmisor** que presenta unas características especiales:

1. Penetra de forma lipofílica en la célula diana
2. No es almacenado en vesículas
3. No tiene enzimas específicas para su metabolismo siendo degradado espontáneamente por oxidación
4. Tiene una vida media de segundos

El receptor natural para el óxido nítrico es la **Guanilil-ciclase** (GCs), pero también puede tener otros mecanismos de acción como mediador en otras vías de transmisión de señales o puede tener un efecto directo mediante **nitrosilación** sobre algunas proteínas, modificándose la función natural de las mismas.

Por otro lado, la vía de señalización óxido nítrico-GCs-GMPc media numerosos procesos fisiológicos (**Rodrigo y cols.**, 1994 y 1997):

- **Relajación músculo liso no vascular** (regulación de tono bronquial, peristaltismo a nivel del sistema gastrointestinal, contracción de útero y corazón, regulación de esfínteres)
- **Relajación del músculo liso vascular** (regulación de presión sanguínea)
- **Neurotransmisión periférica y central**
- **Activación plaquetaria**
- **Fototransducción**

Cabe destacar que la importancia del óxido nítrico no es sólo mediar en situaciones fisiológicas sino que también tiene un papel relevante en situaciones de tipo patológico. La GCs es una atractiva diana terapéutica en situaciones patológicas como el angor, el infarto de miocardio, hipoxia, glaucoma, trombosis o shock séptico donde la activación de esta vía está fuertemente implicada (**Moncada y cols.**, 1991).

A nivel cerebral, entre las funciones que presenta el óxido nítrico en el Sistema Nervioso Central se pueden citar las siguientes (**Rodrigo y cols.**, 2000):

- Autorregulación del **flujo vascular** tanto central como periférico (se produce un incremento del flujo sanguíneo cerebral durante la hipercapnia)
- Activación de **fibras parasimpáticas** que inervan los vasos cerebrales
- Participación en los mecanismos de defensa cerebral ante las **infecciones** mediante microglía
- Participación en procesos de **plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria**
- Participación en fenómenos de **envejecimiento neuronal**

Para *Schuman y Madison* (1991), el óxido nítrico en las neuronas de axón corto, ha sido considerado como un mensajero retrógrado, producido en respuesta a la activación de la excitación de los receptores. También han sugerido varios autores como *Ingram y cols.* (1994); *Vernet y cols.* (1998); *Yamada y cols.* (1998) y *Calabrese y cols.* (2000), que el desequilibrio en su producción podría ser un factor estructural en daños neuronales produciéndose un deterioro funcional durante el **envejecimiento** del cerebro.

En el caso de la participación en la **plasticidad neuronal** se atribuye la particularidad que tiene esta molécula de realizar una transmisión sináptica de carácter retrógrado. Este gas puede viajar desde la membrana postsináptica a la presináptica participando en el “**fenómeno de potenciación de la actividad neuronal a largo plazo**”. Por ello, se encuentra relacionado en procesos tan importantes como la plasticidad neuronal asociada a la **memoria** y el **aprendizaje** (Nathan *C. y cols.*, 1994; *Rodrigo J. y cols.*, 1994 y 1997).

A nivel de retina, el óxido nítrico no solamente se ha visto implicado en procesos de neurotransmisión sino que asume un decisivo papel como mediador en la **regulación del flujo vascular retiniano** (*Roufai E. y cols.*, 1995). En otros estudios, se ha sugerido que la actividad local de la óxido nítrico sintasa de las células amacrinas podría también influenciar en el adecuado desarrollo vascular de la Capa Nuclear Interna (*Patel J.I. y cols.*, 1997). Así pues, los autores citados no sólo han implicado al óxido nítrico en el funcionamiento vascular y neuronal retiniano sino que incluso tendría además un papel destacado en el adecuado *desarrollo retiniano*.

Asimismo, en la corteza visual se han realizado numerosos estudios sobre el óxido nítrico. *Kara P. y Friedlander M.J.* en 1999 estudiaron “in vivo” los potenciales evocados de *corteza cerebral visual en gatos*. Para ello, utilizaron análogos de la arginina y regulando al alza o a la baja la producción de óxido nítrico. Analizaron las respuestas y observaron que cuando el óxido

nítrico se regulaba al alza, aumentaban el número de potenciales de acción evocados por los estímulos visuales, se detectaba una señal mejorada y se producía una disminución del coeficiente de variación de las respuestas evocadas visualmente (mientras que los protocolos de reducción de óxido nítrico tenían los efectos opuestos). De manera que los autores, concluyeron en que el óxido nítrico contribuye a la capacidad del SNC para ***distinguir las señales sensoriales de los ruidos de fondo y además se extrae información sensorial con más fiabilidad.***

En el mismo año, ***Cudeiro J. y Rivadulla C.*** analizaron el papel del óxido nítrico en el *sistema visual en gatos*. Explicaron en su estudio que el óxido nítrico era un mensajero muy especial, ***pues bajo ciertas condiciones puede cambiar el rol para convertirse en “amigo” o “enemigo” neuronal.*** Por otro lado, el óxido nítrico difunde a través de todas las barreras fisiológicas y puede actuar en células vecinas a través de un extenso volumen. Por tanto, el óxido nítrico interviene desde el nivel retiniano hasta el nivel visual cerebral ya que por un lado actúa en el nivel más bajo de la visión, en la ***transducción de la retina***, y por otro lado, realiza un ***control en la excitabilidad neuronal en la corteza visual.***

Más recientemente, en 2008, ***Garthwaite J.***, realizó una revisión en la que se exponía la importancia del óxido nítrico como transmisor químico en el SNC de los mamíferos. El autor habla en su trabajo de las numerosas funciones de óxido nítrico y de la importancia de su actuación tanto en área postsináptica como presináptica actuando sobre el sistema GMPc (de manera

que se ***amplifica la señal neuronal marcadamente y se potencia la comunicación sináptica***). Además, el autor hace hincapié en que el óxido nítrico ***facilita la comunicación entre células endoteliales y neuronales***.

### **1.1.3. Óxido Nítrico y Envejecimiento:**

El óxido nítrico desempeña también un importante papel en el proceso de **envejecimiento**. Con el paso del tiempo, las células sufren un deterioro morfofuncional debido a un proceso involutivo que está determinado tanto por factores genéticos como ambientales. La presencia de radicales libres en las células producen daños oxidativos en el material genético, en los lípidos de las membranas y en proteínas enzimáticas. Las células dañadas irreversiblemente acaban progresando hacia la muerte, bien por mecanismo de apoptosis (fisiológico) o bien mediante necrosis (en patologías). Esta muerte celular acabará deteriorando el tejido y el órgano al que pertenezcan. En el caso de la apoptosis, se trata de un proceso fisiológico que puede ser de vital importancia en los fenómenos de desarrollo evolutivo de órganos y tejidos. Por otro lado, el óxido nítrico actúa como radical libre en los procesos de envejecimiento celular cuando se encuentra en cantidades excesivas en el citoplasma de dichas células (**Rodrigo et al.**, 1998). Además de dicha molécula, intervienen otros radicales libres a este estrés oxidativo como son el superóxido, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y también el peroxinitrito.

#### **1.1.4. El Óxido Nítrico y los Procesos Patológicos**

El **óxido nítrico** aumenta en diversas situaciones patológicas. Los **niveles altos** de óxido nítrico están asociados a una citotoxicidad celular (no específica) mediada por la activación de procesos inmunes y relacionada con ciertas afecciones crónicas.

Así pues, se ha relacionado el óxido nítrico con los procesos fisiopatológicos de la migraña, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y agresiones sufridas por el cerebro en las que se produce excitotoxicidad (**Rodrigo y cols.**, 2000).

En la enfermedad de Huntington, el óxido nítrico liberado de la NOS neuronal puede mediar en la muerte celular relacionada con la alta producción de glutamato. Las interneuronas del *cuerno estriado*, que contienen neuropéptido Y, somatostatina y NOS neuronal, sobreviven durante el desarrollo de la enfermedad aunque se encuentran seriamente dañadas (**Norris P.J.**, 1996).

En la enfermedad de Parkinson, se produce un estrés oxidativo que termina con la muerte neuronal de la *sustancia negra*, se produce un aumento de los niveles de hierro y una disminución del “glutathion” (antioxidante) lo cual daña la función mitocondrial. El óxido nítrico parece estar implicado en la producción de radicales hidroxilos. En estudios

experimentales se indujo artificialmente el Parkinson en ratones con 1-metil-4-fenilpiridinio. Se observó que tanto los ratones “knockout” que carecían de NOS neuronal como en los tratados con un inhibidor de la NOS neuronal, tenían una resistencia a este Parkinson inducido (**Jenner P.**, 1998).

Hay estudios que relacionan alteraciones de la regulación del óxido nítrico con la enfermedad de Alzheimer. En neuronas “enfermas” con anormalidades en el citoesqueleto y sometidas a estrés oxidativo, la dimetilarginasa, enzima que destruye los inhibidores endógenos de la NOS neuronal está elevada. Por tanto, no se inhibe la NOS neuronal y se produce un exceso de óxido nítrico. *Estas alteraciones no fueron encontradas en neuronas normales envejecidas* (**Smith MA**, 1998; **Yew DT**, 1999).

En la Esclerosis Múltiple, **Sherman y cols.**, postularon que la respuesta inmune para la destrucción de melanina y oligodendrocitos estaba mediada por el sistema del óxido nítrico. Los macrófagos/microglía producen un exceso de óxido nítrico que media un exceso de producción de citoquinas (**Sherman M.P. y cols.**, 1992).

En resumen, son múltiples los estudios que coinciden en que el óxido nítrico puede intervenir en la citotoxicidad celular cuando se encuentra en **cantidades excesivas** por diversos mecanismos. El óxido nítrico se encuentra implicado en la nitrosilación de ácidos nucleicos, roturas de ADN, formación de radicales libres e inactivación de enzimas ferrosulfurados que alteraría los procesos energéticos celulares. El óxido nítrico además,

interacciona con el anión superóxido y se produce la formación de peroxinitrito. Finalmente, el peroxinitrito puede nitrar los residuos de tirosina de las proteínas alterando la funcionalidad celular.

### **1.1.5. Sistema Nervioso Central y Óxido Nítrico**

El óxido nítrico es un compuesto químico que actúa como **neurotransmisor** sobre todo a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), su mecanismo de acción parece ser que es el de participar como un mensajero retrógrado intracelular como hemos comentado en apartados anteriores (**Vincent**, 1992). Se ha demostrado en varias investigaciones que el óxido nítrico es capaz de *liberar acetilcolina de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal* (**Prast y Philippu**, 2001) lo que indicaría su participación en las **funciones cognitivas** cerebrales. Por otra parte, se encuentra implicado en **procesos neurodegenerativos** como se ha explicado anteriormente.

El óxido nítrico muestra por tanto una gran variedad de funciones que han sido estudiadas a lo largo de los años desde su descubrimiento, aquí se exponen algunas de estos estudios:

1. Participación en mecanismos de **plasticidad sináptica** (**Gally**, 1990)
2. **Refinamiento de conexiones neuronales** (**Edelman y Gally**, 1992)
3. Participación en mecanismos de **muerte neuronal** (**Dawson**, 1996)

#### 1.1.5.1. Sistema Nervioso Central y el Sistema Guanilil-ciclasa (GMPc):

Está comprobado que el óxido nítrico participa en varias funciones fisiológicas a través de la activación de un **segundo mensajero** denominado GMPc (**Schmidt y cols.**, 1994). Este óxido nítrico parece ser el único, entre los muchos neurotransmisores que existen, que no actúa sobre el receptor de superficie celular, sino que lo hace a través de un enzima intracelular que es una isoforma soluble de la **Guanilil-ciclasa** siendo dicha forma la que hace aumentar los niveles de GMPc en la célula. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha podido observar la localización del enzima guanilil-ciclasa y del GMPc en el Sistema Nervioso Central; detectándose en algunos estudios en sustancia negra y en estriado, corteza cerebelar y en hipocampo. Distintos estudios pueden indicar que el GMPc actuaría de tres formas diferentes:

- como fosfodiesterasa
- como proteína-quinasa
- como canales de iones

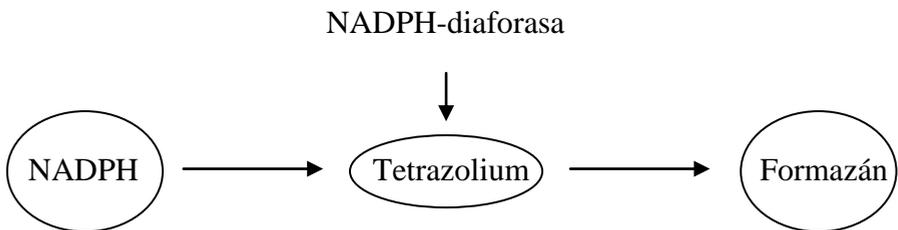
Las fosfodiesterasas son enzimas que catalizan la ruptura de un enlace fosfodiéster como por ejemplo el que se establece en los ácidos nucleicos entre una pentosa y un fosfato, son también llamadas *nucleasas*. Ello conlleva la regulación del GMPc. Una proteína-quinasa es una enzima que modifica a

otras proteínas (sustratos) mediante fosforilación, y por tanto, activándolas o desactivándolas. Ocupan, por tanto, un lugar central en la cascada de respuesta ante una señal química que llegue a la célula. Mientras que la **fosfodiesterasa y la proteína-quinasa** se localizan en el **cerebro** además de otros tejidos, los canales de iones no se localizan en el cerebro pero sí en epitelio olfatorio, corazón y riñón (*Wolf y cols.*, 1997).

## 1.2. LA NADPH-diaforasa:

### 1.2.1. ¿Qué es la Neurona NADPH-diaforasa?

Las **neuronas NADPH-diaforasa ó NADPH-d (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-diaforasa)** fueron descritas por primera vez en el estriado por **Thomas y Pearse** en el año 1961, dichos autores observaron neuronas con alto contenido de la enzima Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) que en presencia de NADPH-diaforasa, se producía la reducción del colorante sal de tetrazolium, a un producto visible, los gránulos de “formazán”.

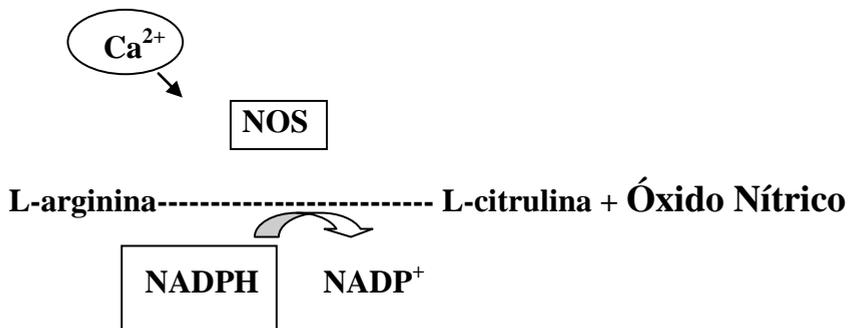


Originalmente, el método se hacía con material no fijado, posteriormente se introdujeron modificaciones que permitieron trabajar con materiales fijados con aldehídos (**Schmidt**, 1994).

Las **neuronas NADPH-d** han sido estudiadas en relación a diferentes funciones metabólicas específicas, parece ser que son **neuronas resistentes a la isquemia, a determinados neurotóxicos** y en enfermedades como el Huntington son neuronas que se mantienen indemnes (resisten a la muerte celular aunque se encuentran dañadas), como hemos explicado en el apartado anterior. Numerosos estudios han establecido una correlación entre la síntesis de óxido nítrico a partir de la **L-arginina** en células que presentan NADPH, con lo que *identificando células positivas para la NADPH-d estaríamos identificando células productoras de óxido nítrico* (**Hope**, 1991; **Dawson**, 1991).

La óxido nítrico sintasa cataliza la formación de óxido nítrico a partir de la L-arginina, esta reacción es  $\text{Ca}^{2++}$  y NADPH dependiente de manera que la L-arginina pasa a **L-citrulina más óxido nítrico** y el **NADPH pasa a NADP**.

Añadiendo a una muestra que tenga células positivas para NADPH el azul de tretazolium y la NADPH-d, los gránulos de tretazolium pasarán a formazán, precipitando en forma de “gránulos de color azul oscuro sobre un fondo rosado”. Es muy interesante destacar que esta deshidrogenasa al tener la peculiaridad de poder ser **marcada histoquímicamente** podremos caracterizar subpoblaciones celulares que quedaran teñidas en **azul oscuro** por dicha reacción. Realizando la reacción histoquímica de la NADPH-d **podremos localizar y estudiar qué células son las que intervienen en la síntesis del óxido nítrico**.



Sin embargo, estas neuronas positivas para NADPH-d no están ligadas a un determinado neurotransmisor sino que en base a métodos inmunohistoquímicos combinados, se ha demostrado que a nivel de la sustancia reticular pontina se encuentra selectivamente ligada a neuronas de tipo **colinérgico** y por otro lado, a nivel de corteza y estriado estas neuronas se encuentran ligadas a la **somatostatina** y al **neuropéptido Y** (*Vincent SR, 1983*).

### **1.2.2. Función de las células NADPH-diaforasa y correlación con el Óxido Nítrico**

Se han publicado numerosos trabajos que **correlacionan la actividad NADPH-d con la síntesis de óxido nítrico** (*Saffrey y cols.*, 1992; *Hope y Vincent*, 1994). La NADPH-d es una enzima encargada de producir el óxido nítrico a partir de la L-arginina actuando como cofactor de la óxido nítrico sintasa. Por tanto, su función última principal dependerá del producto final de dicha reacción química, del óxido nítrico.

Así pues, en el Sistema Nervioso Central el óxido nítrico es sintetizado por células de **axón corto** tras la activación de receptores de aminoácidos excitatorios (*Southam*, 1991). Sin embargo, también las células de **proyección larga** a diferentes niveles del sistema nervioso central tienen actividad NADPH-d (*Wallace M.N.*, 1989; *Meyer G. y cols.*, 1991).

Se ha hallado **una correlación entre la actividad de NADPH-d y la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (NOS-neuronal)**. Existen estudios que establecen una buena relación entre la distribución de las neuronas marcadas con anticuerpos específicos contra la NOS y la de las neuronas marcadas con NADPH-d (*Bredt y cols.*, 1991, *Dawson y cols.*, 1991). Además, *Hope y cols.* en 1991 y 1994 señalaron que todas las neuronas que contenían actividad NADPH-d, también fueron positivas para NOS-neuronal. Por tanto, es posible que **la actividad de NADPH-d estuviera presente**

**en neuronas que producen óxido nítrico “de manera activa”**. Tanto las técnicas histoquímicas como las inmunocitoquímicas dieron resultados semejantes.

Más recientemente, otros autores, **Serrano J. y cols.** en 2006, determinaron que en la corteza cerebral de ratas viejas o ratas sometidas a hipoxia/isquemia-reperfusión, existían neuronas que sólo mostraban la inmunorreacción para NOS-neuronal y no la actividad de la NADPH-d. Este hallazgo hacía suponer que algunas de éstas neuronas podrían ser consideradas como *neuronas silentes en cuanto a la producción de óxido nítrico (contienen la enzima, marcada con el anticuerpo pero no se produce la reacción química, son NADPH-d negativas)*.

### **1.2.3. Distribución de las células NADPH-diaforasa:**

Las células NADPH-d se encuentran distribuidas a lo largo del **SNC**, según **Hope y Vincent** (1994). Se encuentra por tanto, en regiones neuronales que han sido objeto a estudio desde hace años. Estudios sistemáticos de todo el SNC se han hecho en la rata por autores como **Vincent y Kimura** en 1992. Otros estudios se centran en centros concretos o en determinados niveles encefálicos. Son muchos los trabajos que han utilizado la actividad de la NADPH-diaforasa para caracterizar de forma selectiva poblaciones neuronales en varias áreas cerebrales como son el cuerpo estriado (**Sandell JH**, 1986), la corteza cerebral, tanto la sustancia gris como la blanca (**Sandell JH**, 1986; **Meyer G**, 1991; **Meyer G**, 1993), hipocampo (**Mufson EJ**, 1990), hipotálamo (**Sangruchi T**, 1991), el colículo superior (**González-Hernández**, 1992), la retina (**Mitrofanis J**, 1989; **Sagar SM**, 1990), el prosencéfalo basal (**Ellison DW**, 1987) y la sustancia reticular del troncoencéfalo (**Vincent SR**, 1983), a nivel de éste último es llamativa la gran actividad NADPH-d que se produce en el núcleo pedunculopontino (**Skinner RD**, 1989). Estos fueron los primeros estudios en que ya se localizaron las neuronas NADPH-d a nivel de SNC, posteriormente, en otros apartados hablaremos de estudios más recientes de la NADPH-d en SNC.

## **1.3. RECUERDO ANATÓMICO EN HUMANOS**

### ***1.3.1. Corteza Visual Primaria (Área cerebral 17)***

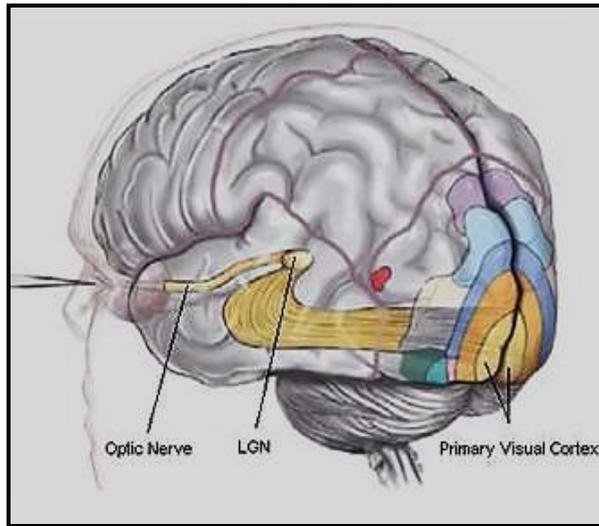
La corteza visual primaria, o estriada, es una estructura mucho más compleja y elaborada que el cuerpo geniculado lateral o la retina. En la corteza encontraremos una mayor variedad de tipos celulares fisiológicamente definidos y las células responden a estímulos más elaborados que tienen que ser adecuadamente especificados.

La corteza cerebral tiene la forma general de un plato cuyo espesor aproximado es de 2 milímetros y cuya área de superficie es algo más de un decímetro. De toda la corteza cerebral, la visual fue la primera que se distinguió del resto por su apariencia laminada o en franjas en una sección transversal, de ahí su nombre clásico de **corteza estriada**. Aunque esta corteza ocupa la mayor parte de la superficie del lóbulo occipital, solo podemos ver aproximadamente de un tercio de la mitad de ella, ya que el resto se encuentra en una cisura calcarina, oculta a nuestra vista. El límite rostral del lóbulo occipital es la cisura parietooccipital que se observa en la cara medial del hemisferio. La superficie lateral del lóbulo occipital está compuesta por las “circunvoluciones occipitales” laterales e irregulares que están separadas en grupos por una “cisura occipital lateral”. En la cara medial del hemisferio, el lóbulo occipital está dividido por la “cisura calcarina” en la

cuña y la “circunvolución lingual”. La cisura calcarina se une rostralmente en “Y” a la cisura parieto-occipital.

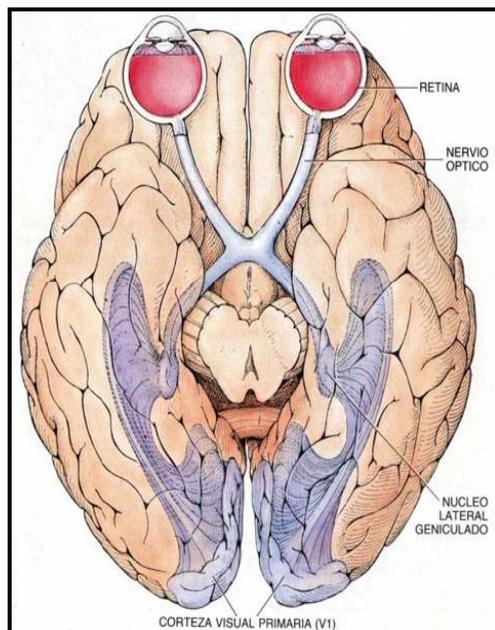
La corteza de ambos bordes de la **cisura calcarina** representa la corteza visual primaria (estriada). En el sistema de numeración neuroanatómico, a la corteza estriada del área visual se le asignó el número 17 de la nomenclatura de BRODMANN, en la actualidad se la denomina “**área visual 1**” ó **V1**. El **área 17** envía gran parte de su información de salida a la siguiente región cortical, el “**área visual 2**” ó **V2** también denominada área 18. El **área 18** forma una banda de corteza de aproximadamente 6-8 mm que rodea al área 17, en cuanto a su estructura es mucho menos compleja que el área 18. El área 18, a su vez, proyecta al menos a tres regiones occipitales denominadas MT (**medial temporal**), **área “visual 3”** y “**área visual 4**” (**V3 y V4**) o área 19. El sistema se complica aún más si se tiene en cuenta que estas áreas proyectan a otras hacia delante pero además pueden volver a proyectar hacia las áreas de las que reciben información. En la figura inferior, figura I.1, podemos apreciar las áreas coloreadas que pertenecen a la corteza primaria con sus aferencias y eferencias. En la figura I.2. se aprecia cómo llega la información visual desde la retina.

La corteza visual de cada hemisferio recibe los impulsos de la **mitad temporal de la retina ipsilateral y la mitad nasal de retina contralateral** (está relacionada con la percepción de la mitad contralateral del campo visual).

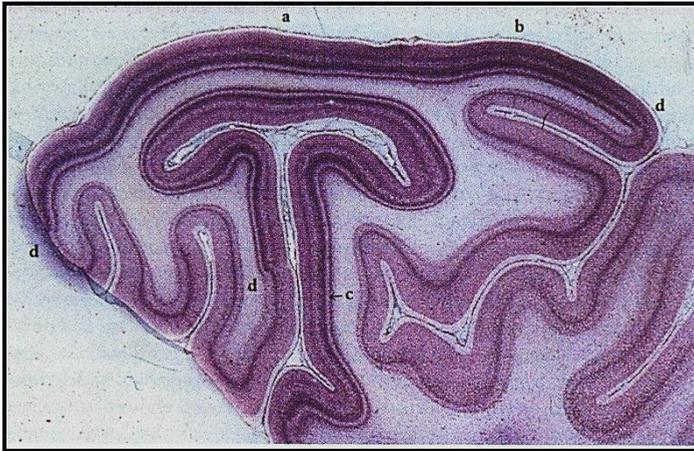


**Fig. I.1.** Corteza visual primaria con áreas eferentes nervio óptico y ganglio geniculado lateral (LNG) y áreas corticales eferentes

*Extraído de:* [astronomos.net23.net/imagenes\\_voltaire/ojolgn.jpg](http://astronomos.net23.net/imagenes_voltaire/ojolgn.jpg)



**Fig. I.2.** Áreas aferentes a la corteza visual primaria.  
*Extraído de:* "Eye, Brain and Vision" (David H. Hubel.; 2005).



**Figura I.3.** Sección transversal del lóbulo occipital teñido con cresil violeta.

*Extraído de:* "Eye, Brain and Vision". (David H. Hubel; 2005)

*Región superficial:*

**a** (proyección foveal de la corteza), **b** (6 grados hacia fuera de la fóvea), **d** (límite con el área 18).

*Región interna (cisura calcarina):*

**c** (80 ó 90 grados desde la fóvea) y **d** (límite interno con el área 18).

En la imagen previa (Fig. I.3.) se muestra una sección transversal del lado derecho del área 17 ó V1. Esta sección se encuentra teñida con cresil violeta, un colorante que tiñe los cuerpos celulares pero no las dendritas ni los axones. No se distinguen células individuales pero se puede observar una capa de corteza expuesta más densamente teñida (constituye la sustancia gris) en la que se encuentran los cuerpos celulares, y otra zona menos teñida en el interior en la que se encuentran los axones (se trata de la sustancia blanca). Podemos observar que hay una parte más teñida y plegada, se trata de una estructura compleja en forma de champiñón, que en realidad es continua a la parte expuesta. En el dibujo previo (Fig. I.2.) se divide el área en zonas:

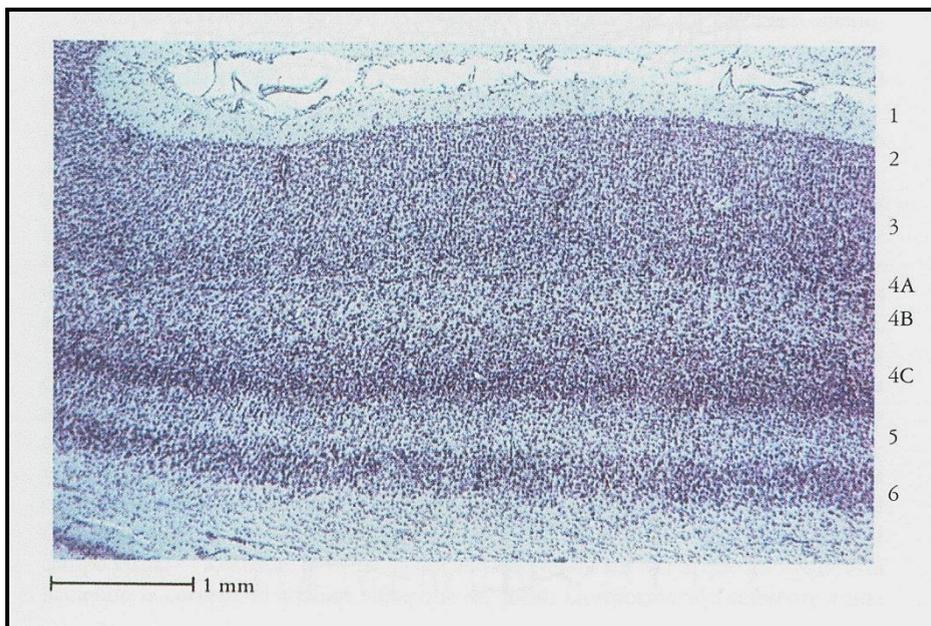
Región superficial: **a** (proyección foveal de la corteza), **b** (6 grados hacia fuera de la fovea), **d** (límite con el área 18).

Región interna (cisura calcarina): **c** (80 ó 90 grados desde la fovea) y **d** (límite interno con el área 18).

Por lo tanto, debemos destacar que la riqueza anatómica del área 17 supera cualquier parte de la corteza. Pero además, posee una mayor complejidad estructural pues tiene a su vez una delaminación interna (ver Fig. I.4.).

A continuación detallamos las capas en las que se encuentra delaminada la corteza visual:

- **Capa 1:** es bastante delgada y claramente identificable, contiene poca cantidad de células entremezcladas con fibras.
- **Capas 2 y 3:** estas capas son muy poco diferenciables y se extienden hasta cerca del 45% de la profundidad total de la corteza.
- **Capa 4:** se caracteriza por ser la capa de células pequeñas, alcanza hasta el 55% de la profundidad de la corteza.
- **Capa 5:** esta capa contiene cuerpos celulares de tamaño medio y grande.
- **Capa 6:** contiene cuerpos celulares pequeños

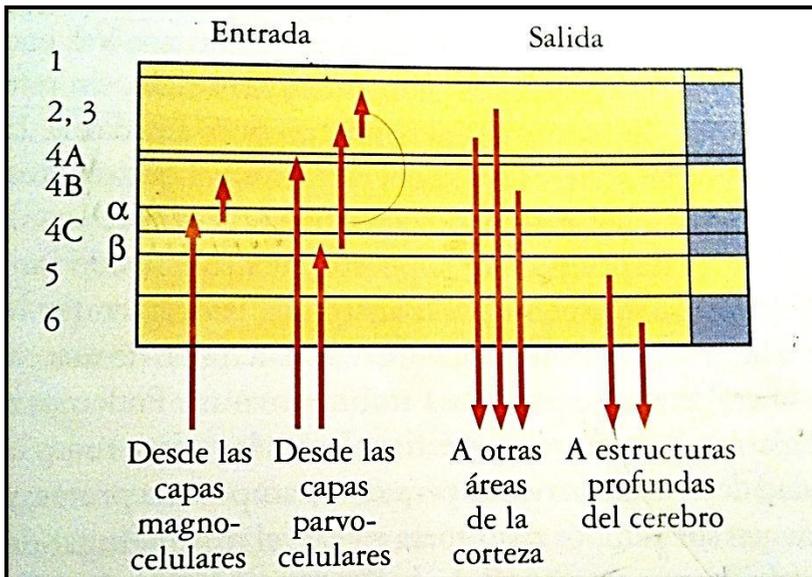


**Fig. I.4.** Sección transversal de la corteza estriada en humano que muestra las células dispuestas en capas con tinción de Nissl.  
*Extraído de:* "Eye, Brain and Vision". (David H. Hubel; 2005)

La capa 4 está subdividida a su vez en subcapas atendiendo a la morfología de sus células y a las conexiones de sus células con los axones procedentes del ganglio geniculado lateral. Así la capa 4 se subdivide en 4 A, B, y C (según sus conexiones) y la capa 4 C a su vez se divide en  $\alpha$  y  $\beta$ . Las fibras que llegan a la corteza desde el ganglio geniculado, entran desde la sustancia blanca, progresando diagonalmente y se extienden hasta la capa 4C, ramificándose multitud de veces para hacer sinapsis en las células estrelladas que pueblan esta capa. Los axones que se originan en las dos capas ventrales (magnocelulares) del geniculado terminan en la mitad superior de 4C,

denominada 4C $\alpha$ ; de las cuatro capas dorsales (parvocelulares) terminan en la mitad inferior de la 4C denominada 4C $\beta$ . Estas subdivisiones de la capa 4C tienen diferentes proyecciones hacia las capas superiores: la 4C $\alpha$  envía su información a la 4B; la 4C $\beta$  a la parte más profunda de la capa 3. La mayoría de las células piramidales de las capas 2, 3, 4B, 5 y 6, envían axones fuera de la corteza, pero las ramas laterales de estos mismos axones descendientes realizan conexiones locales y ayudan a distribuir la información a través de la totalidad del espesor cortical.

En resumen, esta área tiene 6 capas, la capa 4 corresponde a las células que hacen sinapsis con las células del cuerpo geniculado lateral. En la capa 5 se localizan las células binoculares de Hubel y Wiesel encargadas de fusionar las dos sensaciones monoculares que han impresionado puntos retinianos correspondientes y han llegado previamente a la capa 4, para obtener la visión estereoscópica. La capa 5 proyecta para ello al colículo superior. Por último, la capa 6 proyecta de vuelta al geniculado lateral. Esta área cerebral, también posee una capa de fibras mielinizadas acelular, la estría de Gennari que le da nombre (corteza estriada). En la Figura I.5. se puede observar un esquema de las principales conexiones efectuadas por los axones:



**Fig. 1.5.** Esquema de las principales conexiones efectuadas por los axones desde el cuerpo geniculado lateral a la corteza estriada y desde la corteza estriada a otras conexiones cerebrales. A la derecha, el sombreado azul muestra la relativa densidad de la tinción de Nissl para su comparación con la Fig. 1.3.

**Extraído de:** "Eye, Brain and Vision" (David H. Hubel; 2005)

En cuanto a las **conexiones** las más importantes son las que corren hacia arriba y hacia abajo respecto a la superficie de la corteza cerebral visual pero también existes de otro tipo como las diagonales y las de lado a lado, éstas se extienden 1 o 2 milímetros. Si las aferencias se encuentran organizadas topográficamente, lo mismo debe ser cierto para las eferencias; por lo tanto, el análisis tiene que ser local. La información de una pequeña parte del mundo visual llega a una pequeña porción de la corteza, se transforma, analiza y se envía para su posterior procesamiento a otras áreas, sin referencia a lo que está ocurriendo al lado.

Por otro lado, morfológicamente, los dos tipos de células principales corticales son las *células piramidales* y las *células estrelladas*; ambas pueden ser pequeñas o grandes. Las estrelladas están presentes en todas las capas y las piramidales en todas menos en la 1 y la 4. Esta clasificación está hecha siguiendo su morfología, pero funcionalmente, Hubel describió dos tipos celulares, con independencia de su morfología. Éstas son: células simples y células complejas. (**“Eye, Brain and Vision”. David H. Hubel; 2005**).

## **1.4. RATA WÍSTAR COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN**

En primer lugar expondremos algunos comentarios sobre la rata Wístar, utilizada como modelo experimental en nuestro trabajo de investigación. Hemos pensado en reflejar la historia de este animal y por qué ha sido utilizada.

La rata Wístar (Fig. I.6.) pertenece al orden de “rodentia” y a la familia “muridae”, es la denominada “rata de laboratorio”, o “rattus norvegicus”, que en realidad ha sido utilizada como modelo experimental en investigaciones científicas solamente desde hace unos cien años, lo que se considera relativamente poco tiempo si la comparamos con otras especies animales tales como los conejos, pollos o gatos (**Baker HJ**, 2007).

En cuanto a sus características como animal, cabe destacar que se trata de un animal que no tiene una gran capacidad de visión teniendo incluso incapacidad para distinguir los colores, son por tanto el oído y el olfato sus sentidos más desarrollados. Se trata de un animal que es muy activo durante la noche. Puede vivir más de tres años aunque la media de vida es de dos años. Los machos llegan a pesar más de 500 g. y las hembras aproximadamente 300 g. Sus órganos poseen características particulares, por ejemplo, no tiene vesícula biliar y posee un pliegue en el esófago que le impide vomitar. El pulmón izquierdo tiene un solo lóbulo mientras que el derecho posee cuatro

lóbulos. Presenta unas pequeñas glándulas lagrimales en la parte posterior del globo ocular, cuya secreción es rica en lípidos y porfirinas con lo que en periodos de estrés el animal presenta una coloración en párpados rojiza, lo cual ocurre también en la nariz. El principal regulador de la temperatura es la cola (**Mills J.**, 1998).

El desarrollo de técnicas especiales para lograr ambientes asépticos durante la crianza y mantenimiento de las colonias animales, los equipos y materiales utilizados en la actualidad así como las prácticas en el buen manejo de los animales han logrado la producción en serie de ratas sanas, cuyo bienestar tiene como consecuencia la reducción del estrés del animal y también conlleva una reproducción constante a lo largo de todo el año. Todo ello redunda en el abastecimiento de los laboratorios y una reducción en el número de individuos utilizados o sacrificados en investigación, además de controlar un gran número en las variables distorsionales para los resultados obtenidos.



**Fig. I.6.** Rata Wistar.

**Obtenido de:** [cerebrodarwin.blogspot.com/](http://cerebrodarwin.blogspot.com/)

A finales del siglo XIX, se creó el “Instituto Wistar” en memoria del médico Caspar Wistar (1761-1818). Este Instituto Wistar ocupa un lugar especial en la historia de las ciencias biomédicas, y es considerado la cuna de la rata de laboratorio. Wistar nació en Filadelfia y fue Catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pensilvania. Escribió el primer libro de texto americano sobre Anatomía, expuso la utilidad de las vacunaciones y trabajó para combatir la epidemia de la fiebre amarilla de 1793. Fue gran amante de las ciencias, desarrollando trabajos no sólo de medicina sino también de botánica, paleontología y geografía.

Años más tarde, Henry Donaldson (1857-1938), fundó la primera colonia de ratas que más tarde se llamarían Wistar. De hecho, la creación de las ratas Wistar como “animales estándar de investigación” puede ser atribuida al trabajo de Helen Dean King, con la ayuda de Louise Duhring y bajo la supervisión de Henry Donaldson. La comunidad científica mundial debe el uso de las ratas Wistar a los laboratorios Milton Greenman que fue el primero en pensar en que esta especie era adecuada para servir a la ciencia. Se documentó, extrajo ideas de la uniformidad del producto, estándares de calidad y eficiencia en la producción, aplicándolos a la práctica científica, para generar un modelo animal para los laboratorios (**Clause B**, 1993).

En nuestro trabajo experimental, se utilizan ratas Wistar estableciendo un “patrón de normalidad” que nos permita conocer las bases del envejecimiento y cambios de plasticidad neuronal a nivel de corteza visual investigando los cambios en la organización citoarquitectural y en la

plasticidad neuronal durante el envejecimiento. Estas neuronas relacionadas con la síntesis del óxido nítrico se han podido localizar mediante técnicas de inmunohistoquímica, son las denominadas NADPH-diaforasa. Es importante destacar por último, que la actividad NADPH-d se presenta en poblaciones celulares morfológicamente bien definidas y son constantes en la escala filogenética, de ahí su valor en la anatomía comparada.

### **1.4.1. Anatomía comparada**

La anatomía comparada es una de las aplicaciones de la histoquímica de la NADPH-d con más posibilidades. Se han realizado múltiples trabajos con dicho método en rata, gato y hombre siendo relativamente pocos los realizados en no mamíferos. Así pues, **Meyer y González-Hernández** (1993) realizaron tinciones en diferentes especies, reptiles, aves y anfibios, pudiendo comprobar que la **NADPH-d se encuentra en poblaciones neuronales muy constantes a lo largo de la escala filogenética**. Esto puede ayudar a establecer homología y diferencias entre diferentes centros y entre poblaciones neuronales. En su estudio constataron que determinadas poblaciones neuronales como células intersticiales de la sustancia blanca cortical, también se caracterizan por el contenido de la enzima, *tanto en el hombre como en la rata*.

## 1.5. ACTUALIZACIÓN DEL TEMA

### 1.5.1. Actualización a nivel experimental con animales

#### 1.5.1.1. NADPH-d en la Retina

En la retina de la rata, la técnica histoquímica NADPH-d reveló principalmente una clase de células denominadas Tipo I y que se localizaban en la capa nuclear interna de la retina (**Mitrofanis**, 1989; **Roufail E.**, 1997; **Cheon**, 2002). Existen otras células denominadas de Tipo II, no consideradas amacrinas y descritas por **Kim I.B. y cols.** (2000) y **Kim K.Y. y cols.** (2000). Estas células tipo II no habían sido descritas previamente por otros autores (**Mitrofanis**, 1989).

En los mamíferos, algunos autores también han descrito tipos celulares inmunorreactivos para la enzima Óxido Nítrico Sintetasa ( **J.I. Patel**, 1997; **E. Roufail**, 1997; **S.J. Oh**, 1998; **M.H. Chun**, 1999; **I.B. Kim**, 1999; **E.Cheon**, 2002). Algunas de las células relacionadas con dicha enzima se han hallado concretamente en células amacrinas, en la capa plexiforme interna y externa, en la capa de células ganglionares, en fotorreceptores, en células bipolares y en grandes vasos de la coroides (**Patel JI**, 1997). Se ha encontrado una asociación entre células inmunorreactivas para la Óxido Nítrico Sintasa y la tinción NAPH-diaforasa positiva. En un estudio realizado en retina de

conejos se teñían tanto cuerpos y procesos de células amacrinas como también células en vasos sanguíneos retinianos según **Rockhill R.L. y cols.** en el año 2000. Dicha autora también refleja en su estudio que el Óxido Nítrico de origen neuronal juega un importante papel en la *actividad de interrelación neural a nivel de retina*, en la *regulación del flujo sanguíneo* y en el *metabolismo retiniano*. Esto sugiere que dicho papel puede desempeñarse también a nivel **cerebral** (haciendo referencia al trabajo realizado por **U. Dirnagl** en 1994 en el que se relaciona el óxido nítrico y la adenosina con la regulación del flujo sanguíneo a nivel cerebral).

En cuanto al momento embrionario de aparición de estas células en la retina, se ha documentado que las células NADPH-d-positivas amacrinas se han encontrado en retina periférica más tempranamente en el periodo postnatal en ratas en el día P 3 (es decir, el tercer día postnatal) según **Mitrofanis** en 1989. Por otro lado, las células inmunorreactivas para la Óxido Nítrico Sintasa (utilizando la técnica de detección con los anticuerpos específicos) son detectadas más tarde en el día postnatal P 5 en retina central (**I.B. Kim, 2000; K.Y. Kim, 2000**). Según los autores de dichos estudios, las células positivas para NADPH-d están totalmente diferenciadas en la **segunda semana** de vida de la rata, **cuando los ojos están abiertos**. Este hecho nos sugiere el importante papel que pueden representar en la visión estas células.

Se considera pues, que el óxido nítrico puede jugar un papel importante como mediador en la maduración de la retina. Se ha sugerido una implicación

del óxido nítrico a nivel de retina en la **regulación de la proliferación y muerte neuronal**. En el trabajo realizado por **Kim K.Y. y cols** (2002) sobre la administración de la L-arginina, sustrato de la NOS, se demostró que se produjo un aumento en la proliferación y muerte celular en el periodo postnatal de retina de rata. Este efecto fue mayor a partir del día **quinto postnatal, periodo en el que aparecían las células NADPH-d**, con lo que coincide con los autores anteriores en el probable importante papel del óxido nítrico en la **maduración de la retina de la rata**.

Por primera vez, **Roufail y Rees** en 1997, realizaron un estudio en retina de *ratas* y humanos en el que analizaban los cambios en células amacrinas que contenían la NOS y **no se encontraron cambios significativos en su distribución y número “en relación al envejecimiento” en la retina de la rata ni en humanos**.

Más recientemente, **L. Palanza y cols**. (2005) localizaron también las células NADPH-diaforasa a nivel de la *capa nuclear interna* como células *amacrinas*. Realizaron un estudio de su desarrollo y evolución desde periodo postnatal hasta la *madurez en la retina de la rata*, teniendo en cuenta “**los cambios que se producen en relación a la edad**” de la rata. En este trabajo, realizaron un análisis cuantitativo y de la distribución de las células NADPH-d positivas. El objetivo era estudiar la regularidad o no de distribución y número de estas células analizando si dicha distribución se mantenía desde los primeros estadios de vida o bien se producía mediante la eliminación/adición de nuevos elementos celulares. Según estos autores, el

óxido nítrico difunde libremente a lo largo de las membranas celulares y actúa sobre células vecinas mediante la activación del sistema de la GMPc (como se ha detallado en apartados anteriores). Esta activación se produce *tanto en las células amacrinas como en las células bipolares, favoreciendo así los contactos sinápticos* en la capa plexiforme interna de la retina de la rata. Por otra parte, en sus resultados la *densidad de las neuronas amacrinas que sintetizan el óxido nítrico, tienen un crecimiento en número con un pico máximo de densidad celular en el día P 14. Es precisamente en este momento en el que se “abren los ojos de las ratas” con lo que la síntesis de óxido nítrico alcanza su madurez completa en este momento de la vida de la rata.* Posteriormente se “mantienen” en número, lo cual concuerda con el trabajo previo de Roufail y Rees. En cuanto a la distribución de las células NADPH-d también se tiende a la regularidad pero sin embargo hay una mayor homogeneidad en los campos estudiados en las zonas centrales que en las zonas periféricas de la retina en donde hay mayor dispersión. Los autores resaltaron por otro lado, que el estudio de la distribución de las células NADPH-d puede representar un sustrato celular para analizar patrones de conectividad neuronal y concluyen en que la **alteración en su distribución podría ser la base de algunas de las patologías de la retina.** Esta alteración contribuiría a un deterioro funcional y además a una alteración en la regulación del flujo sanguíneo local en la retina de la rata.

Un último artículo publicado en Diciembre de 2012 por **May C.A.** estudió también los cambios que se producían en relación a la edad en células amacrinas NADPH-d en la retina de ratones desde un día de vida hasta los treinta meses de vida. Los resultados coincidieron tanto con L. Palanza ya que se objetivó un pico máximo de estas células en el día 14 postnatal y posteriormente ***no se produjeron cambios en relación con el envejecimiento*** (en esto último coincidían también con Roufail).

#### 1.5.1.2. NADPH-d en el Nervio Óptico

En el nervio óptico, en los trabajos más recientes, se intenta investigar mecanismos de neuroprotección que pudieran revolucionar los tratamientos en el glaucoma. Su estudio ha experimentado una evolución que analizaremos a continuación.

El papel del óxido nítrico es complejo. El óxido nítrico es una molécula que en modelos animales ha sido implicada tanto en procesos de ***neuroprotección*** como en ***neurodestrucción*** pudiendo actuar como regulador del flujo vascular provocando vasodilatación en situaciones de isquemia o bien como radical libre neurotóxico (***Dawson VL***, 1996).

En 1999, ***Shareef y cols.***, publicaron un trabajo en el que se estudiaban las tres isoformas de la NOS a nivel de nervio óptico de *ratas* y en relación a *presiones intraoculares moderadamente elevadas*. Estos autores

querían establecer un modelo experimental con rata Wistar. Se provocó el glaucoma en uno de los ojos de cada rata mediante cauterio de venas episclerales utilizando el ojo contralateral a modo de control. De esta manera, se objetivó la aparición de la isoforma NOS-inducible en el ojo que tenía la presión intraocular elevada en los cuatro días posteriores y persistió durante tres meses. La NOS-inducible no estaba presente en los ojos normales contralaterales. Estos autores concluyeron en su estudio que las células positivas para la isoforma inducible, eran astrocitos reactivos al aumento de la presión intraocular y que participaban en la destrucción neuronal. Estos hallazgos indicaron que la isoforma inducible producía un óxido nítrico que podría participar en los fenómenos de neurotoxicidad.

En el mismo año, 1999, **Neufeld y cols.** realizaron un estudio experimental con ratas, en el que se producía una *inhibición de manera selectiva de la NOS-inducible* con aminoguanidina (utilizada en modelos de diabetes previamente pues inhibe la glicosilación; **Corbett**, 1992). Querían observar si se producía una *neuroprotección en el glaucoma*. Un grupo de ratas en las que se había inducido el glaucoma, fue tratado mientras que otro grupo, también con glaucoma inducido, no fue tratado. Los resultados fueron que en el grupo no tratado la pérdida de células ganglionares fue de un 36% mientras que, en el grupo tratado se produjo sólo una pérdida de un 10% sugiriendo que el tratamiento podría actuar como neuroprotector. Es decir, **si inhibimos la isoforma inducible selectivamente (y no las otras**

**isoformas) podríamos proteger la pérdida de células ganglionares en el glaucoma.**

En el año 2000, **Sugiyama y cols.**, realizaron un estudio en *papila de nervio óptico* con un modelo experimental con *conejos albinos*. Se les administró intravenosamente L-NAME (inhibiendo la **NOS** a diferentes dosis) o solución salina fisiológica y se evaluó el flujo sanguíneo a nivel de papila de nervio óptico, la presión intraocular y la presión arterial. Veinte minutos después de la administración de L-NAME, se les administró L-arginina. También se administró Acetilcolina a todos los conejos independientemente de haber sido tratados o no con el inhibidor. Los resultados de **Sugiyama** fueron que por un lado, la administración del inhibidor de la NOS, L-NAME, produjo un descenso en los parámetros del flujo vascular de manera dosis-dependiente. Es decir, si inhibimos la NOS disminuye el flujo vascular a nivel de papila de manera dosis-dependiente. Por otro lado, dosis altas de L-NAME producían incluso un aumento de la presión intraocular (dosis de más de 100 mg/Kg).

En cuanto a la administración posterior al inhibidor de **L-arginina**, se observó que los *parámetros de flujo vascular ascendían a niveles normales basales, pues se bloqueaba al propio inhibidor*. Sin embargo, en el caso de la Acetilcolina, cuando se había administrado previamente el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, no se producía el ascenso a niveles basales de flujo vascular (pues continuaba actuando el inhibidor), pero sí aumentaban los parámetros en los conejos placebo. Por tanto, concluían en que el **óxido**

**nítrico regula basalmente el flujo vascular en papila de nervio óptico** y que la Acetilcolina promueve la síntesis del óxido nítrico mejorando la el flujo vascular. Sugiyama afirmaba en su estudio que **inhibir la NOS alteraba el flujo vascular, disminuyéndolo**, es decir, la NOS en condiciones basales puede ser neuroprotectora. Hay que tener en cuenta que en este estudio se estaban inhibiendo la NOS en todas sus isoformas , lo cual podría indicar que el efecto general más importante sería el de regulación del flujo vascular que conllevaría una neuroprotección.

Más recientemente, en 2002, **Okuno y cols.** realizaron otro estudio experimental con conejos sobre la autorregulación vascular del óxido nítrico en papila de nervio óptico en relación con *altas presiones intraoculares..* Crearon primero un *modelo experimental de glaucoma.* Introducían en cámara anterior de conejos una perfusión de suero salino con una cánula de manera que, subían la presión intraocular a 50 mmHg. Se inyectó en un grupo la L-NAME o inhibidor de la NOS. Otro grupo fue utilizado como control. Se observó que el tiempo de los Potenciales Evocados Visuales se prolongó en los conejos en los que se había inyectado el inhibidor de manera dosis-dependiente. El flujo de sangre en la papila no se redujo en principio sólo con el aumento de la presión intraocular, pero sí se redujo significativamente por L-NAME. Estos resultados, según estos autores, sugieren que el **óxido nítrico desempeña un papel en la autorregulación de la circulación de la papila cuando se eleva la presión intraocular, es decir representaría**

**una neuroprotección en la fase aguda de la isquemia del nervio óptico.**

En 2006, **Vidal y cols.** realizaron un estudio en el que se creó un modelo experimental con *ratas Wistar* a cuales se les provocaba glaucoma en un ojo y se estudiaba el efecto sobre la NOS según si se administraba o no el *maleato de timolol* (fármaco utilizado como hipotensor ocular). Se estudiaron las tres isoformas de la enzima NOS tanto en papila como en retina, en el grupo control con glaucoma y en el grupo tratado con maleato de timolol. Los autores observaron que en las ratas que habían sido tratadas con maleato de timolol se producía una *disminución de la expresión de la NOS-neuronal tanto en retina como en nervio óptico*. Por otro lado, la **NOS-inducible sólo se expresaba en un pequeño grupo de astrocitos reactivos** y la *NOS-endotelial se mantenía estable*. Estos resultados sugerían que el timolol podía producir una neuroprotección gracias a una reducción del exceso de óxido nítrico, que se produce reactivamente tras el aumento de presión intraocular, sin alterar la **NOS-endotelial** considerada por estos autores como **neuroprotectora**.

Tras el análisis de los artículos publicados sobre el tema, no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio que detecte la NADPH-d en el nervio óptico de la rata pero sí en otros animales. En marzo de 2008, **Clemente y cols.**, publicaron un trabajo en el que se caracterizaron células positivas para *NADPH-d en el nervio óptico de la tenca*. En estos animales se puede dar regeneración de la vía visual tras una lesión en cualquiera de sus

partes. Se estudió en condiciones normales y tras seccionar el nervio en diferentes periodos de supervivencia del animal. Se utilizaron marcadores de astrocitos (S100 y glutamina sintetasa) y marcadores de microglía (lectina). Tanto astrocitos como oligodendrocitos fueron positivos para NADPH-d. Tras la sección del nervio óptico, se observó la aparición de *nuevas células NADPH-d* que se consideraron astrocitos (pues todas eran positivas para S100). Es decir, *las células NADPH-d intervienen en los procesos de degeneración y regeneración neuronal a nivel de nervio óptico.*

En enero de 2009, **Petropoulos y cols.**, publicaron su investigación sobre el efecto del inhibidor de la NOS, L-NAME, en la presión parcial de oxígeno a nivel de disco óptico en condiciones de normales y en *hipercapnia* (inhalando CO<sub>2</sub>) en *cerdos*. Se realizó la medición mediante electrodos sensibles al oxígeno colocados a menos de cincuenta micras de la papila. Se observó que antes de la inyección del inhibidor, durante la hipercapnia, se produjo un aumento de la presión parcial de oxígeno a nivel de la papila. Tras la inyección del inhibidor, la presión parcial de oxígeno en papila disminuyó y este efecto fue reversible con L-arginina. Por otro lado, en condiciones normales la presión parcial de oxígeno se mantuvo estable durante 30 minutos tras la inyección de L-NAME a pesar de un 21% de aumento de la presión media arterial. Los autores concluyeron que en condiciones de normales, un inhibidor sistémico de la NOS no afectaba a la presión parcial de oxígeno. Sin embargo, en condiciones de hipercapnia, sí se producía una franca afectación en la presión parcial de oxígeno de papila. Por tanto, el *óxido*

nítrico se consideraría un **mediador del aumento de la presión parcial de oxígeno de papila en condiciones de hipercapnia, es decir, se consideraría neuroprotector.**

En marzo de 2009, **Balaratnasingam y cols.** , estudiaron el efecto neuroprotector de la NOS sobre el nervio óptico en condiciones de *elevación de la presión intracraneal en cerdos*. En el estudio se observó que tras la elevación de la presión intracraneal, se produjo un aumento de la isoforma NOS-endotelial, sugiriendo que se trata de una respuesta compensatoria que se inicia por el esfuerzo de preservar la función neuronal. Se sugiere que cambios en los niveles de **NOS-endotelial pueden ser un importante factor en las primeras etapas de tolerancia neuronal a un aumento de la presión intracraneal.** Actuaría por tanto, como factor neuroprotector y este hallazgo podría ser de especial importancia en enfermedades como la hidrocefalia.

Por último, la mayoría de estudios realizados se han centrado en el analizar la funcionalidad de la NOS en el nervio óptico. No se han documentado estudios en nervio óptico que relacionen la NOS con el envejecimiento de manera que, podamos saber si existe o no regularidad de distribución o bien, un cambio en el número de células positivas para la enzima.

### 1.5.1.3. NADPH-d en el Ganglio Geniculado Lateral

Varios estudios previos han descrito la presencia de la NOS neuronal a nivel del Ganglio Geniculado Lateral (**Mitrofanis**, 1993; **Vincent y Kimura**, 1992; **González-Hernández y cols.**, 1993 y 1994; **Gabbott y Bacon**, 1994; **Rodrigo y cols.**, 1994).

Sin embargo, no es hasta 2003, cuando **Villena A. y cols.** publican un estudio en el que se analizan las neuronas NADPH-d *en relación a la edad de la rata Wistar en esta área*. Para ello, utilizaron ratas de 3, 24 y 26 meses de vida y en las que se realizó un análisis cuantitativo por mm<sup>2</sup> y un análisis de los cambios en el tamaño del soma. También estudiaron los cambios en la orientación dendrítica de estas neuronas con la edad, comparando ratas jóvenes con viejas. En los resultados de su trabajo, se observó que se producían dos tipos de tinciones en dichas neuronas con regiones marcadas, bien definidas en bandas. Esta *distribución se mantuvo estable en las diferentes edades* de la rata aunque se pudo observar que *la tinción fue más débil en ratas viejas* y que además *se detectó un menor número de neuronas NADPH-d* aunque las bandas se mantuvieron bien definidas. En los alrededores del Ganglio Geniculado también se observó una banda ancha correspondiente a la cinta óptica, lo cual indica que también presentan células NADPH-d. Se pudieron diferenciar además, diferentes tipos de neuronas, según la intensidad de la tinción, el tamaño y la morfología, y las clasificaron en neuronas **tipo A**, fuertemente teñidas, con variabilidad de tamaño y

morfología, consideradas “neuronas de proyección”. Por otra parte, se hallaron células clasificadas como de **tipo B**, consideradas dentro de “circuitos locales”, también fuertemente teñidas y de tamaño pequeño. Las de tipo B tenían normalmente forma de huso, con dos dendritas que salían de polos opuestos. Este patrón se observó en las tres edades de las ratas de manera similar con lo que ***no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas en relación a las variaciones morfológicas*** de las neuronas NADPH-d.

Por otro lado, en el **análisis cuantitativo** se observó que se produjo entre las ratas de 3 meses de edad y las de 24 meses un **descenso del 36% de neuronas NADPH-d** (aunque se mantenían estables en las ratas de 26 meses de edad, es decir, no seguían disminuyendo). Estos autores afirman en su estudio que piensan que este descenso en el número de neuronas NADPH-d  *puede significar un descenso en la producción de óxido nítrico en las ratas de edad en comparación con ratas jóvenes, lo cual podría afectar al funcionamiento del cerebro en ratas viejas.*

#### 1.5.1.4. NADPH-d y Sistema Nervioso Central

En cuanto a su localización en el cerebro, cabe destacar que no existe una correlación entre las determinaciones bioquímicas y los estudios histoquímicos. *Bioquímicamente, el **cerebelo** es el que mayor actividad diaforasa tiene, debido probablemente a su neuropilo (el neuropilo es el área*

compuesta de un ovillo denso de terminales axónicos, dendritas y células gliales comprendiendo además las conexiones sinápticas de las ramificaciones de axones y dendritas). Sin embargo, en el cerebelo histoquímicamente sólo se tiñen algunas neuronas de axón corto. Por otro lado, la **protuberancia** contiene gran cantidad de neuronas positivas para la NADPH-d, pero por electroforesis tiene menos de la mitad de la actividad diaforasa que el cerebelo.

Además, como ocurre en la vía visual, existen neuronas que se tiñen de manera muy marcada, oscuras, cuyas dendritas se tiñen más intensamente y que probablemente esté relacionado con una mayor concentración de la enzima, mientras que otras neuronas son menos teñidas, de manera que según diversos autores se han clasificado de manera diferente utilizando diferentes símbolos a la hora de interpretar los resultados. El neuropilo presenta estas mismas características, de manera que en los núcleos medial y cortical de la **amígdala** se encuentran muy oscuro mientras que en otras zonas cerebrales muy claro, como en el núcleo central lateral talámico. En general, se debe tener en cuenta que la **mayor actividad de células NADPH-d se encuentra en neuronas, no en células gliales (Meyer y González-Hernández, 1993)**.

De todos los trabajos revisados con referencia al SNC y la NADPH-d, que son múltiples, hemos considerado destacar los que relacionan este tipo de neuronas con el **envejecimiento**. En algunas áreas cerebrales se produce con la edad una *disminución de las células NADPH-d*, esto es en “núcleo

tegmental y laterodorsal pedunculopontino (**Lolova y cols.**, 1996) y en el “estriado” (**Kuo y cols.**, 1997). En otras áreas, como son el “córtex cerebral” (**Huh y cols.**, 1997) y el “hipocampo” (**Yamada y Nabeshima**, 1998) *no se detectaron diferencias significativas* con la edad respecto al grupo control (todos estos estudios fueron realizados con ratas). En otras áreas cerebrales, sin embargo, se detectó con la edad un *aumento del número de células NADPH-d* como en el prosencéfalo basal en humanos (**Haug y cols.**, 1983; **Coleman**, 1987).

**Díaz F. y A. Villena**, en 2006 realizaron un trabajo sobre la actividad de neuronas NADPH-d en las capas superficiales del **Colículo Superior** de ratas *“en relación con la edad”*. En el estudio se analizaron las capas superficiales del colículo superior relacionadas con vías reflejas de la visión. Para ello, se utilizaron ratas albinas Wistar, seis de cada edad, 3 meses, 24 y 26 meses de vida. El análisis cuantitativo y morfológico se hizo teniendo en cuenta la orientación de los procesos dendríticos, el tamaño del soma y el número de células NADPH-d. Se estimaron los cambios en el tamaño del soma neuronal realizando cinco secciones de cada rata y se proyectaron los somas en un monitor de manera que se trazó con el cursor los somas, siendo trazados 700 perfiles en total. El número de neuronas fue estimado por mm<sup>2</sup>.

En los resultados, los autores encontraron que las ratas presentaban un alto número de neuronas NADPH-d en las capas superficiales del colículo sobre todo en la capa zonal superficial y en la capa gris externa, siendo

mucho menos numerosas en la capa óptica. Esto se observó tanto en las ratas consideradas adultas como en las ratas viejas.

En cuanto al tamaño del soma neuronal hubo diferencias cuando fueron comparadas las ratas de 26 meses de edad con las de 3 meses produciéndose una **disminución del tamaño del soma con la edad**.

En el **número de neuronas NADDPH-d no se produjo ningún cambio significativo con la edad** en todos los tipos morfológicos manteniendo en las tres edades los mismos porcentajes en cada tipo. En cuanto a la orientación dendrítica, sí se produjeron cambios con la edad disminuyendo produciéndose un **aumento de las orientaciones dendríticas dorsoventrales en detrimento de las lateromediales** (estos cambios se produjeron en neuronas de orientación vertical pero en las piriformes y horizontales).

En las conclusiones, los autores hacen referencia a trabajos realizados por otros investigadores (**Coleman y Flood**, 1986 y 1987) en los que también quedaba patente una **reorganización del árbol dendrítico con la edad probablemente se postuló que se producía para mantener la eficacia de las conexiones neuronales**. Se podría decir, según estos autores, que se producen **fenómenos morfológicos de plasticidad sináptica**. Estos hechos se han relacionado con una **reacción compensatoria a los cambios relacionados con atrofia de neuronas**

vecinas (**Arendt y cols.**, 1994; **Lolova y cols.**, 2000; **Villena y cols.**, 2003).

**Sánchez-Zuriaga y cols.**, en 2007, del grupo de investigación de la Dra. Rosa Peris de la Facultad de Medicina de Valencia, analizaron los cambios en la edad de las NADPH-d en el **Colículo Inferior y en el Córtex Auditivo de ratas Wistar**. En sus resultados, observaron una **disminución del tamaño del soma de las neuronas NADPH-d en el Colículo Inferior** sobre todo a nivel de corteza dorsal del mismo. Probablemente, según los autores, estos hallazgos se relacionan con una disminución con la edad de la síntesis de óxido nítrico en las vías de comunicación cortico-coliculares (sin poder comparar sus resultados con otros autores al no haberse publicado ningún trabajo en relación a la edad en el colículo inferior previamente). En el caso del Córtex Auditivo, y coincidiendo en este caso con los resultados de **Ouda y cols.** (2003), también se produjo una **disminución del número de células NADPH-d**. Observaron también un **aumento del número de dendritas** en éstas probablemente, según estos autores, como **mecanismo compensatorio sináptico**.

Sin embargo, recientemente, en Diciembre del 2012 , **Junyang Jung y cols.**, publicaron un estudio en el que se produjo un aumento en el número de neuronas NADPH-d en Colículo Inferior en relación a la edad con lo que se requieren estudios posteriores que puedan aportar más datos sobre estas neuronas en esta región cerebral.

#### 1.5.1.4.1. NADPH-d en la Corteza Visual

**Yan X. X. y cols.** en 1995, publicaron un trabajo en el que se analizaba los cambios en el número de neuronas NADPH-d en los centros visuales tras la sección del nervio óptico contralateral en la rata Wistar. Tras realizar la sección, se observó un *aumento de neuronas NADPH-d* en las capas ópticas del colículo superior, el núcleo ventral del cuerpo geniculado lateral y la corteza visual primaria de la rata. El máximo número de neuronas se observó a los 30 días (con un rango entre 4-60 días). El trabajo sugería, según estos autores, que **en centros denervados del área visual se produce un aumento de neuronas que producen óxido nítrico**, lo cual le confiere **probablemente un efecto neuroprotector**.

**Yousef T. y cols.**, en abril de 2004, publicaron un estudio en el que se identificó la distribución de dos isoformas de la NOS, la neuronal y la endotelial en la corteza visual de ratas Wistar. Ambas isoformas estaban presentes a nivel cortical. Utilizaron tanto anticuerpos específicos para NOS como el método inmunohistoquímico de la NADPH-d. En sus resultados, encontraron células positivas para NADPH-d, y además una amplia red de fibras débilmente positivas que se consideraron presumiblemente axones. La **isoforma endotelial fue encontrada en vasos sanguíneos pero también en neuronas** pudiendo diferenciarse de la isoforma neuronal gracias al método de anticuerpos. En su trabajo, las neuronas con la isoforma endotelial y neuronal fueron más numerosas que las que sólo tenían NOS-

neuronal, representaron un 60% de las células corticales. Sin embargo, **no se encontraron neuronas específicas que sólo tuvieran la isoforma endotelial, sino que eran células que contenían “ambas isoformas”**.

**Zhang Y. y cols.**, en noviembre de 2004, estudiaron las células NADPH-d y su implicación en el desarrollo del sistema visual en el hámster recién nacido. Durante el desarrollo postnatal de la corteza visual del hámster observaron un aumento transitorio de la actividad de la NOS, que coincidía temporalmente con la formación de la retina ipsilateral y de las proyecciones coliculares y retina-geniculado, lo que sugiere la participación de NOS en la **maduración de la corteza visual**. Además, utilizaron un inhibidor de la NOS y examinaron sus efectos. Tras administrarse el inhibidor, aumentó la mortalidad y además se produjo una disminución del peso corporal y una supresión del crecimiento de neuronas NADPH-d corticales. Por otro lado, se estudió el número de apoptosis celular en los animales control produciéndose ésta sobre todo en las capas II y III corticales durante la maduración normal del cerebro. Cuando se administró el inhibidor de la NOS el número de apoptosis disminuyó y se alteró ésta maduración cerebral. Concluyeron finalmente, que el **óxido nítrico puede servir como una señal de activación de apoptosis durante el proceso de desarrollo del córtex visual**. Desempeñaría pues, un importante papel en la maduración de la corteza visual en el hámster.

Por otro lado, **Lee J. y Chang-Jin Jeon**, publicaron en ese mismo año, 2004, un trabajo en el cerebro del hámster y además, en 2005 realizaron un

trabajo en la corteza de la rata y el conejo, en los que se analizaba una localización inmunohistoquímica de neuronas que contenían la enzima NOS, co-localizándola en relación con proteínas calcio-dependientes. Como otros autores, en el córtex visual de la rata, diferenciaron los dos tipos de coloración, y apuntaron que las débilmente teñidas fueron 8-9 veces más numerosas que las fuertemente teñidas. En el córtex visual del conejo, la única diferencia con la rata fue que el número de las menos teñidas, era 6-5 mayor que las más teñidas. En la distribución por capas, también coincidieron con los autores citados anteriormente en las dos especies de animales, **las más teñidas o Tipo 1 se localizaban en la capa VI mientras que la menos teñidas y más abundantes, las Tipo 2 se localizaban sobre todo en las capas corticales II/III.** En cuanto a la descripción de la morfología de las neuronas, se basaron en el estudio solamente de aquellas que estaban intensamente teñidas (ó Tipo 1) ya que así se podían diferenciar claramente tanto el soma como las dendritas. En la rata, se encontraron células redondeadas u ovals, células estrelladas de gran tamaño (ambas con dendritas en todas las direcciones), y células pequeñas fusiformes con dendritas solamente en disposición horizontal o vertical. El porcentaje fue:

- 64.8% redondas u ovals
- 26.3% estrelladas
- 10.8% horizontales
- 4.1% verticales

En el conejo, los resultados fueron también similares.

Así como en otras áreas de la vía óptica como la retina y el ganglio geniculado se han realizado estudios de las neuronas NADPH-d en relación con el envejecimiento, no hemos hallado ningún trabajo que se realice en córtex visual con células NADPH-d en relación con la edad.

### ***1.5.2. Actualización experimental en primates y en humanos (consideraciones de aplicación clínica)***

#### ***1.5.2.1. NADPH-d en Retina y Nervio Óptico***

A nivel de retina en humanos, ***Provis y Mitrofanis*** (1990) revelaron varias clases de células morfológicamente diferenciables NAPH-diaforasa positivas. Se trataba de células amacrinas y se diferenciaban por la forma y el tamaño de su soma. Posteriormente, ***Roufail and Rees*** en 1997, realizaron un estudio en retina de *ratas* y en *humanos* en el que analizaban los cambios en células amacrinas que contenían la NOS y *no se encontraron cambios significativos en su distribución y número en relación a la edad*. Más recientemente, ***Shengxiu Li y cols.*** en 2006, realizaron un estudio de la Óxido Nítrico Sintasa *endotelial* (en anteriores estudios nos referimos a la neuronal) a nivel de retinas de *fetos humanos de 8 a 28 semanas de gestación*. Concluye dicho estudio en que dicha enzima ***no sólo interviene como reguladora del flujo vascular, sino que además tiene un papel en el desarrollo retiniano en humanos***.

En el año 1997, **Neufeld y cols.**, realizaron un trabajo en *humanos* estudiando secciones histológicas de la papila del nervio óptico *en sujetos normales y en pacientes con glaucoma*. Mediante anticuerpos identificaron las tres isoformas (neuronal, endotelial e inducible) de la NOS. En sus resultados, en ojos normales, la **NOS-neuronal** estaba escasamente presente en los astrocitos de la papila de nervio óptico. Sin embargo, en ojos con glaucoma casi todos los astrocitos eran positivos para la enzima. Por otro lado, la **NOS-endotelial** se encontraba presente en el ojo normal en el endotelio vascular. En los ojos con glaucoma, estaba presente también en astrocitos y en endotelio vascular de vasos grandes y pequeños. El hallazgo más importante fue que la isoforma **NOS-inducible**, *no se encontró en ojos normales pero sí estaba presente en astrocitos en la lámina cribosa de ojos con glaucoma*. Finalmente, concluyeron su estudio afirmando que se había encontrado una mayor presencia de NOS-neuronal y una síntesis “de novo” de la NOS-inducible en astrocitos de la lámina cribosa. Esto sugería, según estos autores, que la papila estaría expuesta a niveles excesivos de óxido nítrico, siendo localmente neurotóxico y afectando a los axones de las células ganglionares de la retina. Por el contrario, según estos autores, la mayor presencia de la NOS-endotelial podría considerarse neuroprotectora, causando un mayor aporte de flujo sanguíneo en el tejido.

Posteriormente, en el año 2000, **Luksch y cols.**, publicaron un trabajo en el que se realizaba una evaluación de los efectos de la *inhibición sistémica de la NOS en la regulación vascular a nivel de coroides y nervio óptico en*

*humanos*. Para ello, utilizaron dos grupos de varones (a doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo) en el que se trataba a uno de ellos con de NG-nitro-Larginine (L-NAME), un inhibidor competitivo de la arginina, con lo que se inhibía a la NOS. Después, se medía con flujometría láser Doppler, el flujo sanguíneo coroideo y en papila de nervio óptico en ambos grupos. El resultado fue que, efectivamente, la L-NAME reducía todos los parámetros de flujo vascular tanto a nivel de coroides como en la papila del nervio óptico y además, era dosis-dependiente. Este fue el primer estudio que demostró que el óxido nítrico es liberado continuamente a nivel de papila de nervio óptico y que se trata de un importante regulador vascular a este nivel.

Por primera vez en 2007, se realiza “in vivo”, en **pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto** un estudio utilizando la L-NAME, **inhibiendo la NOS de manera sistémica**. Utilizaron un grupo de doce pacientes con glaucoma y un grupo de doce pacientes sin glaucoma de edades similares. El estudio objetivó una respuesta anormal del flujo vascular a la inhibición de la NOS, tanto en papila como en coroides. Esto indicó una alteración del sistema L-arginina/óxido nítrico en el glaucoma. Se observó que los pacientes con glaucoma tenían una disminución de la respuesta al inhibidor, lo cual puede indicar que hay un *aumento de la actividad basal de la NOS en tejidos oculares glaucomatosos*. En ellos sería necesario aumentar la dosis de L-NAME para alcanzar reducciones en el flujo vascular ocular, comparables a los sujetos sanos. Estos resultados concuerdan con los

hallazgos de Luksch y Neufeld, en los que se encontraba un aumento de la expresión de la NOS en ojos con glaucoma.

### 1.5.2.2. NADPH-d y Sistema Nervioso Central

En 1986, **Sandell** fue el primero en describir en cerebros de monos dos tipos de células positivas para la NADPH-d, unas con una fuerte tinción y otras más débilmente teñidas. Para **Wolf y cols.** 1992, este tipo de marcado más débil se debe a que se trata de células en donde se detecta la actividad en las mitocondrias pero, no son positivas para la NADPH-d en el citoplasma. A la misma conclusión llegaron **Aoki y cols.** en un trabajo realizado en monos en 1993. Estos dos tipos de positividad neuronal en la tinción también se describieron en 1994 por **Lüth y cols.**, en cerebro humano. Encontraron **neuronas positivas para NADPH-d en íntima relación con los vasos sanguíneos**. Estos autores, afirmaron que la funcionalidad del óxido nítrico se encontraba *relacionada con los vasos sanguíneos* a nivel cortical. Esta correlación la explican en que si hay áreas con mayor actividad metabólica, también se producirá mayor necesidad de oxígeno. Posteriormente, **Yan y cols.** en 1996 en monos confirmaron los resultados de estos autores.

En 1995, **Faro R.L. y cols.**, publicaron un estudio en el que se describía la actividad de la *NADPH-d en la corteza visual primaria de humanos* (cuatro autopsias cerebrales de individuos normales, de 4 a 8 horas tras la muerte). El estudio tuvo como resultados que la *predominancia de estas neuronas era en*

la capa VI, aunque también se observaron en el resto de las capas (excepto la capa 4c). El 85% de las células NADPH-d se localizaban en la sustancia blanca. Sin embargo, los autores no establecen cambios en el patrón NADPH-d en función de la edad de los individuos pues no se utilizó como parámetro en el estudio.

Posteriormente, **Aoki y cols.** en 1997, realizaron un trabajo en el área V1 de los macacos con el receptor postsináptico **NMDA** (*N-metil-D-aspartato*, relacionado con fenómenos de plasticidad neuronal) correlacionándolo con un anticuerpo para la NOS. Cuando dicho receptor es activado, se producen altas concentraciones de calcio y así se produce síntesis de óxido nítrico. Este óxido nítrico podría modular esta potenciación sináptica excitándola o inhibiéndola. Por tanto, el óxido nítrico podría estar relacionado con la **modulación de las vías de plasticidad neuronal durante el proceso visual**, como propusieron también **Harsany y Friedlander** en el mismo año en su trabajo.

**Wong-Riley y cols.**, en 1998, realizaron un estudio en el que se hacía una colocalización de la **citocromo oxidasa** (marcadora de actividad metabólica) con anticuerpos para NOS y NADPH-d en monos. Estos autores concluyeron en que dichas células son probablemente interneuronas. Observaron que algunos procesos dendríticos de las células fuertemente teñidas, se veían **íntimamente relacionados con vasos sanguíneos**, como habían observado previamente otros autores (**Lüth y cols.**, en 1994; **Yan y cols.** 1996; **Gonchar y cols.**, 1997). Esta relación, según estos

autores, puede tener implicaciones con la funcionalidad del óxido nítrico, que es un potente vasodilatador. Así pues, estas **neuronas podrían tener un papel en la regulación local del flujo vascular a nivel cortical.**

**Wiencken y Casagrande**, en 1999 y 2000, efectuando un estudio en *córtex visual de diferentes tipos de primates*, confirmaron los *dos tipos de coloración en las neuronas NADPH-d*, que habían sido descritos anteriormente por los autores ya citados. Estudiaron la distribución y correlación de las células NADPH-d con los anticuerpos para la NOS. Realizaron además una correlación entre estas células con la *citocromo oxidasa y el receptor de membrana NMDA*. De esta manera, estos autores pensaban que **identificando los diferentes tipos celulares y sus compartimentos funcionales con marcadores neuronales, se puede intentar comprender la organización funcional del sistema visual.** En cuanto a la coloración, a las células más teñidas (tanto el axón como las dendritas estaban fuertemente teñidos) y menos abundantes, las denominaron células **Tipo 1**. Las menos teñidas (por lo tanto, más difícil de determinar su morfología) y más abundantes las denominaron **Tipo 2**. En la distribución, estos autores, observaron que las células **Tipo 1** se encontraban, en V1 (área 17), **en la sustancia blanca, por debajo de la capa VI y en menos cantidad en las capas II, III y V** (los resultados concuerdan con Aoki, 1993). Esta situación celular en la sustancia blanca sugería, según estos autores, que eran células antiguas del córtex cerebral. Por otro lado, en el caso del área V2 (área 18) observaron que estas células Tipo 1 fueron más

abundantes en la *capa IV*. Sin embargo, las células **Tipo2**, más abundantes pero menos teñidas, no estaban presentes en la sustancia blanca por debajo de la capa VI (en ningún tipo de primate estudiado), pero sí que se veían **en todas las capas** tanto en V1 como en V2, *sobre todo en la capas supragranulares*. En cuanto a la organización funcional, el estudio reveló que las neuronas NADPH-d tenían una correlación con *áreas de alta actividad metabólica relacionándola con la citocromo oxidasa*. Concluyen, como los autores mencionados anteriormente, que al ser áreas de mayor actividad requieren una adecuada **regulación del flujo vascular** donde probablemente intervienen neuronas que sinteticen óxido nítrico. Por otro lado, existe una fuerte asociación de neuronas positivas para NOS con el receptor NMDA, lo cual sugiere de nuevo, el papel que podría tener el óxido nítrico en **fenómenos de plasticidad neuronal** (como sugería **Aoki** en 1997).



## **2. Justificación, Hipótesis y Objetivos**



## **2.1. JUSTIFICACIÓN**

El óxido nítrico es un gas que es sintetizado en distintas células del organismo y que tiene un papel crucial como molécula de señalización celular. Los sistemas de transducción de señales en los que interviene el óxido nítrico son especialmente relevantes en el cerebro. Además, se ha observado que el óxido nítrico facilita la comunicación entre células endoteliales y neuronales, encontrándose implicado en la regulación del flujo sanguíneo a nivel cerebral. Por ello, cuanto mejor estudiada esté esta importante molécula y las células encargadas de su síntesis mejor comprenderemos los mecanismos fisiológicos de envejecimiento neuronal y los mecanismos patológicos de las enfermedades neurodegenerativas.

Para su estudio, se deben localizar las células que lo sintetizan. La enzima encargada de sintetizarlo a partir de la L-arginina es la Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Para ello, requiere la presencia de dos cofactores, el ión calcio y el fosfato dinucleótido adenina nicotinamida reducida (NADPH). Esta enzima tiene tres isoformas que se encuentran distribuidas en numerosos tejidos. Las isoformas son: isoforma endotelial, la isoforma macrófaga y la isoforma neuronal. La técnica de inmunohistoquímica de la NADPH-d se encuentra relacionada con la NOS-neuronal. Gracias a esta técnica se pueden teñir selectivamente las neuronas que son productoras “activamente” de óxido nítrico y realizar un mapa detallado del tejido neural estudiado.

En cuanto a su funcionalidad, esta molécula tiene la particularidad de actuar como neuroprotector o como neurotóxico, según diferentes condiciones que han sido estudiadas por numerosos autores de manera que puede cambiar el rol de amigo a enemigo neuronal. Por ejemplo, en concentraciones elevadas puede actuar como radical libre implicado en el deterioro neuronal, pero también se ha visto implicado en fenómenos de mejora del flujo vascular por ejemplo en modelos experimentales en el glaucoma con lo que actuaría en determinadas circunstancias como neuroprotector.

El óxido nítrico es un neurotransmisor-neuromodulador y tiene la capacidad de realizar una transmisión sináptica de carácter retrógrado. Por tanto, este gas puede viajar desde la membrana postsináptica a la presináptica participando en “fenómenos de potenciación de la actividad neuronal a largo plazo”. Por ello, se encuentra relacionado en procesos tan importantes como la plasticidad neuronal asociada a la memoria y el aprendizaje. También se le ha asociado a la regulación de la actividad sináptica estando implicado tanto en los procesos madurativos neuronales como en procesos de envejecimiento cerebral y neurodegenerativos. Por tanto el estudio de las neuronas NADPH-d puede representar un sustrato celular para analizar patrones de conectividad neuronal y entender mejor tanto el envejecimiento neuronal como las enfermedades neurodegenerativas.

En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson se ha observado que si se bloqueaba la NOS-neuronal en modelos experimentales los animales

tenían resistencia al Parkinson inducido con lo que estos autores lo consideraban neurotóxico. En el Alzheimer se ha demostrado que la NOS-neuronal se encontraba también elevada con lo que se producía un exceso de óxido nítrico que actuaba como neurotóxico. Y finalmente, en la Esclerosis Múltiple se han hecho estudios que han demostrado un exceso de producción de óxido nítrico por la microglía. Por tanto, un desequilibrio en su producción podría ser un factor estructural en daños neuronales produciéndose un deterioro funcional en las enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, el óxido nítrico participa en procesos de protección neuronal. Por ejemplo, el óxido nítrico juega un papel importante como mediador en la maduración de la retina estando implicado en regulación de la proliferación y muerte neuronal durante su maduración. Así se ha visto en varios estudios que se produce un pico en el número de células NADPH-d positivas en el momento en que la rata abre los ojos, que es el día 14 postnatal. También en el nervio óptico se ha puesto de manifiesto en estudios experimentales en animales, que gracias al óxido nítrico se produce una vasodilatación que favorece el aporte de flujo vascular a la papila en condiciones de hipertensión ocular.

A nivel de corteza cerebral visual primaria se ha observado en varios estudios que el óxido nítrico actúa como una señal de activación de apoptosis durante el proceso de desarrollo del córtex visual. Desempeñaría pues, un importante papel en la maduración de la corteza cerebral visual además de

estar implicado en la regulación del flujo vascular a nivel de la misma. Por último, según algunos trabajos en ratas cuando se denervaba el nervio óptico contralateral se producía un aumento del número de neuronas NADPH-d en la corteza visual primaria como un efecto probablemente compensatorio con lo que los autores sugerían también un efecto neuroprotector a este nivel.

Se ha relacionado también al óxido nítrico con el envejecimiento. Se sabe que el estrés oxidativo es un factor crítico en la patogénesis de envejecimiento. Existe una evidencia creciente que sugiere que el óxido nítrico excesivo contribuye al proceso de envejecimiento. Sin embargo, todavía no está claro cómo el óxido nítrico desempeña un papel en el proceso de envejecimiento debido a la dualidad en el comportamiento de esta molécula, ya que no hay relación con el déficit de la misma. Por ello, se han realizado numerosos estudios que tratan de analizar los cambios de las neuronas NADPH-d en condiciones fisiológicas durante el envejecimiento en diferentes regiones cerebrales. Por ejemplo, a nivel de corteza primaria auditiva se ha visto una disminución de neuronas NADPH-d en relación a la edad y de manera probablemente compensatoria un aumento del árbol dendrítico de la mismas (postularon los autores que podría deberse a un intento de aumentar la potencialidad sináptica como fenómeno compensatorio).

En el sistema visual los cambios en el número de neuronas NADPH-d en relación con el envejecimiento han sido diferentes según el área estudiada en ratas Wistar. A nivel de retina no se han objetivado cambios en el número de

células NADPH-d (amacrinas) en relación con la edad según diversos autores. En el ganglio geniculado lateral los resultados han sido diferentes según diversos estudios, unos autores no han encontrado cambios significativos en este tipo de neuronas en relación con la edad (aunque sí un aumento en la intensidad de la tinción) mientras que otros sí han puesto de manifiesto una disminución del número de neuronas. Por último, en el colículo superior tampoco se han encontrado cambios en el número de neuronas en relación a la edad según un estudio reciente, aunque sí se han observado cambios en el patrón dendrítico probablemente según los autores del estudio como plasticidad sináptica. Sin embargo, no hemos encontrado ningún trabajo que analizara los cambios cuantitativos y distributivos a nivel de corteza visual primaria de las neuronas NADPH-d.

## **2.2. HIPÓTESIS**

Una vez expuesto el papel de las neuronas NADHP-d en la producción del óxido nítrico, y la implicación de esta molécula en los procesos madurativos e involutivos cerebrales, nos planteamos realizar un trabajo de investigación experimental en rata albina Wistar, para verificar la siguiente hipótesis de trabajo:

*“Deben existir cambios cuantitativos y cualitativos de las neuronas NADHP-d a nivel de la corteza visual primaria en relación al envejecimiento”*

Para ello será prioritario identificar dichas neuronas en las diferentes capas de la corteza visual primaria y constatar sus modificaciones a lo largo de la vida. Consideramos que deben producirse cambios que supongan una adaptación a la pérdida de neuronas.

Así pues, ésta fue la finalidad de nuestro estudio, analizar los cambios evolutivos que deben existir en estas neuronas NADPH-d productoras de óxido nítrico en V1 en relación a la edad en la rata Wistar. Por lo que más que las cantidades de óxido nítrico, serán las neuronas NADPH-d las que se modificaran en la corteza visual de la rata Wistar en el envejecimiento.

## 2.3. OBJETIVOS

Con la realización del estudio propuesto se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

1. Localizar **neuronas productoras de óxido nítrico en la corteza visual primaria** o V1 en **ratas de una semana de vida** (consideradas jóvenes), **ratas de tres meses de vida** (consideradas adultas) y **ratas de un año de vida** (consideradas viejas).
2. Analizar la **densidad poblacional** de neuronas NADPH-d **en V1** y sus *cambios en relación a la edad de la rata*.
3. Estudiar la **distribución en las capas corticales en V1** de las neuronas NADHP-d y sus *cambios en relación a la edad de la rata*.
4. Determinar la **orientación** de estas neuronas respecto a la superficie de la corteza visual primaria y si se producen cambios de plasticidad neuronal *en relación al envejecimiento cerebral* en este tipo de neuronas.



# **3. Material y Metodología**



### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. SELECCIÓN DE RATAS WÍSTAR**

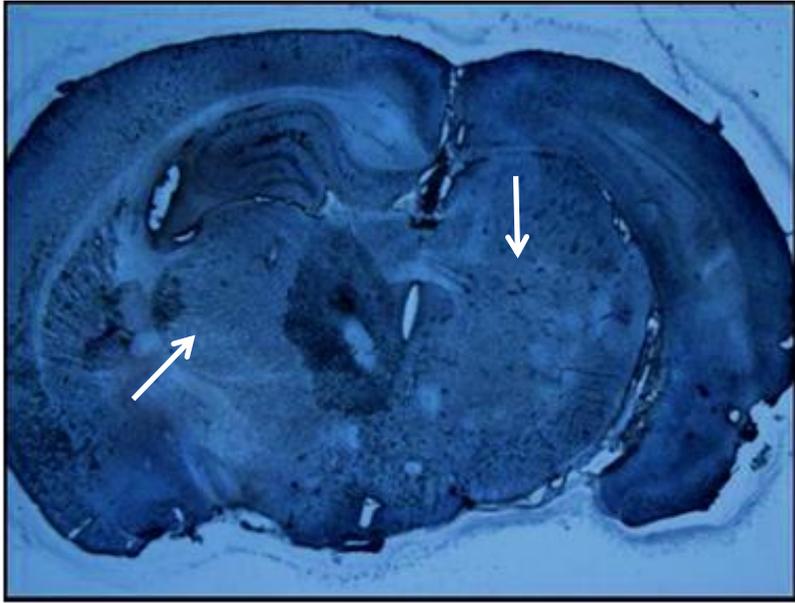
Este trabajo lo hemos realizado en la “Unidad de Investigación Oftalmológica Santiago Grisolia”, adscrito a la Fundación de la Generalitat Valenciana para la Investigación del Hospital Dr. Peset de Valencia.

Hemos utilizado como material en la investigación, la rata Wistar cuyo nombre científico es *Ico: WI (IOPS AF/Han)*. La rata Wistar pertenece al orden de “rodentia” y a la familia “muridae”, es la denominada “rata de laboratorio”, o “*Rattus norvegicus*”. Esta rata ha sido utilizada como animal de experimentación desde hace años, fue seleccionada por HH Donaldson en el Instituto Wistar de Estados Unidos a principio de siglo. Se trata de un animal polivalente desde el punto de vista experimental con una vida media de aproximadamente un año y medio que la hace especialmente útil en estudios de envejecimiento y de supervivencia, con lo que podemos ver los cambios evolutivos que se producen en su sistema neurológico desde el nacimiento hasta la vejez de la misma. Es un animal cuyo cerebro está perfectamente sistematizado en el mapa de Paxinos y cols. (1999) lo que nos permite localizar con bastante precisión las áreas cerebrales de interés.

Los animales utilizados en nuestro estudio se obtuvieron del animalario del Instituto de Biomedicina del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Valencia, en condiciones estándar.

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con las leyes de la Comunidad Europea para la investigación animal (86/609/EC; 24 Nov 1986) y con la aprobación de los responsables del centro donde se realizó el trabajo, así como del comité de investigación de dicho centro.

Se utilizaron pues, tres grupos de ratas albinas Wistar hembras en las que se estudiaron la corteza visual primaria en animales de una semana, tres meses y un año de vida. Dichas edades corresponden al periodo postnatal, edad adulta y vejez de la rata. Fueron estudiadas una serie de ratas en cada uno de los grupos consideradas aptas para el estudio, es decir, hubo ratas que no se consideraron aptas por diferentes motivos. Uno de ellos fue que hubieron cortes histológicos que no se fijaron adecuadamente en los portas y las tinciones no eran aptas para nuestro estudio. Por otro lado, en ratas viejas de un año de vida se detectaron en dos casos tumores cerebrales con lo que tampoco las utilizamos en nuestro estudio, en la imagen siguiente (Fig. III. 1.) se aprecia una tumoración que desplaza las estructuras cerebrales:



*Fig. III.1. Corte histológico de cerebro de rata Wistar teñido con Nissl de un año de edad en el que se aprecian tumoraciones que desplazan estructuras cerebrales (flechas)*

A continuación exponemos los datos de las ratas utilizadas en nuestra investigación especificando el peso de cada una de ellas y el tamaño del cerebro:

3.1.1.1. Ratas de una semana de vida

<b>RATA</b>	<b>EDAD</b>	<b>PESO</b>	<b>M.C.L.</b>
<b>Rata 1</b>	1 semana	11 gramos	12 mm
<b>Rata 2</b>	1 semana	12 gramos	13 mm
<b>Rata 3</b>	1 semana	11 gramos	11 mm
<b>Rata 4</b>	1 semana	13 gramos	14 mm
<b>Rata 5</b>	1 semana	12 gramos	13 mm
<b>Rata 6</b>	1 semana	10 gramos	11 mm
<b>Rata 7</b>	1 semana	12 gramos	11 mm
<b>Rata 8</b>	1 semana	15 gramos	13 mm
<b>Rata 9</b>	1 semana	10 gramos	12 mm
<b>Rata 10</b>	1 semana	12 gramos	11 mm
<b>Rata 11</b>	1 semana	13 gramos	12 mm
<b>Rata 12</b>	1 semana	12 gramos	10 mm
<b>Rata 13</b>	1 semana	14 gramos	14 mm
<b>Rata 14</b>	1 semana	14 gramos	13 mm
<b>Rata 15</b>	1 semana	12 gramos	10 mm

*M.C.L.: Medida cerebral longitudinal*

3.1.1.2. Ratas de tres meses de vida:

<b>RATA</b>	<b>EDAD</b>	<b>PESO</b>	<b>M.C.L.</b>
<b>Rata 1</b>	3 meses	183 gramos	19 mm
<b>Rata 2</b>	3 meses	198 gramos	23 mm
<b>Rata 3</b>	3 meses	205 gramos	22 mm
<b>Rata 4</b>	3 meses	215 gramos	25 mm
<b>Rata 5</b>	3 meses	173 gramos	20 mm
<b>Rata 6</b>	3 meses	167 gramos	21 mm
<b>Rata 7</b>	3 meses	171 gramos	20 mm
<b>Rata 8</b>	3 meses	212 gramos	22 mm
<b>Rata 9</b>	3 meses	214 gramos	22 mm
<b>Rata 10</b>	3 meses	165 gramos	20 mm
<b>Rata 11</b>	3 meses	184 gramos	21 mm
<b>Rata 12</b>	3 meses	211 gramos	23 mm

*M.C.L.: Medida cerebral longitudinal*

3.1.1.3. Ratas de un año de vida:

<b>RATA</b>	<b>EDAD</b>	<b>PESO</b>	<b>M.C.L.</b>
<b>Rata 1</b>	1 año	303 gramos	18 mm
<b>Rata 2</b>	1 año	310 gramos	17 mm
<b>Rata 3</b>	1 año	295 gramos	19 mm
<b>Rata 4</b>	1 año	310 gramos	16 mm
<b>Rata 5</b>	1 año	308 gramos	19 mm
<b>Rata 6</b>	1 año	310 gramos	19 mm
<b>Rata 7</b>	1 año	297 gramos	17 mm
<b>Rata 8</b>	1 año	344 gramos	18 mm
<b>Rata 9</b>	1 año	295 gramos	16 mm

*M.C.L.: Medida cerebral longitudinal*

### **3.1.2.-Sacrificio del animal**

Para el sacrificio del animal efectuamos de manera sistematizada en todos los animales los siguientes pasos:

**1.** Cada rata a estudio fue anestesiada con cloroformo en un principio y cuando estuvo dormida se inyectó vía intraperitoneal en la mesa de estereotaxis dos anestésicos (0.5mL de ketamina y 0.5 mL diazepam).

**2.** Con la rata completamente dormida, se realizaba toracotomía y apertura de la aurícula derecha. Posteriormente se procedía a realizar una perfusión con fosfato buffer 0.1 M, pH 7.4, a través del ventrículo izquierdo ya que de esta manera se sangraba al animal limpiando el árbol circulatorio hasta que por la aurícula salía la perfusión sin sangre (nuestro objetivo era obtener las muestras lo más exangües posibles para su adecuado procesamiento).

**3.** Posteriormente, por la misma vía se perfundía paraformaldehído al 4% para realizar la fijación del cerebro. Es importante en este paso que se produjeran movimientos tónicos de la cabeza del animal “pseudoconvulsivos” puesto que ello nos aseguraba que el paraformaldehído llegaba a la cabeza y por lo tanto que la fijación del tejido era la correcta. Una vez fijada, la rata era decapitada extrayendo cuidadosamente el cerebro con material quirúrgico adecuado. Se introducía el cerebro en el líquido fijador (paraformaldehído) y se añadía sacarosa al 30% durante 24h-48h a 4°C en nevera.

4. Pasado este tiempo, se retiraba el cerebro del líquido fijador y se cortaba el polo frontal cerebral (el procedimiento se detalla posteriormente) para comenzar con los cortes en un área más cercana a la corteza visual primaria.

5. Se situaba posteriormente el cerebro ya sin la región frontal cerebral en un molde orientado longitudinalmente (como se aprecia en la Fig. III.2.) y se rellenaba con gel congelante (“Freeze Gel“ Cola para cortes de congelación referencia 071 11245) para crear un bloque con el cerebro y poderlo congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un congelador “Haier ult freezer”.



**Fig. III.2.** *Cerebro de rata Wistar adulta en el molde preparado para utilizar el gel congelante. Este procedimiento se llevaba a cabo de manera sistematizada en todos los animales estudiados.*

### **3.1.3.-Obtención de los cortes histológicos**

En la obtención de los cortes histológicos también se utilizaba una sistemática que se realizaba en cada uno de los animales a estudio. Para ello, tuvimos en cuenta las siguientes consideraciones:

En el atlas de Paxinos y cols. (1999) el cerebro estándar mide 20mm, como en nuestro estudio los cerebros tenían medidas diferentes según la edad y características del animal, se realizaba una regla de tres para llegar al Bregma 5.6 (que es donde empieza a aparecer la V1) en cada cerebro y así empezar los cortes lo más cerca posible de este Bregma. Un ejemplo de ello sería, si en el cerebro estándar de Paxinos el punto que nos interesa está a diez mm de la parte anterior del polo frontal, en un cerebro de 12mm de una rata de una semana de vida el punto que nos interesa estará a “X” mm de dicha área.

Así pues:

20 mm  $\longrightarrow$  10 mm

12 mm  $\longrightarrow$  X mm X= 6 mm

Sin embargo, en realidad retirábamos un milímetro menos del calculado (en este caso sería 5 mm) es decir, comenzábamos los cortes seriados un poco antes de llegar al Bregma deseado para así asegurarnos de que en todos los casos se estudiaba toda el área visual primaria en su total extensión. La sección la efectuábamos como mostramos en la figura siguiente (Fig. III.3.):

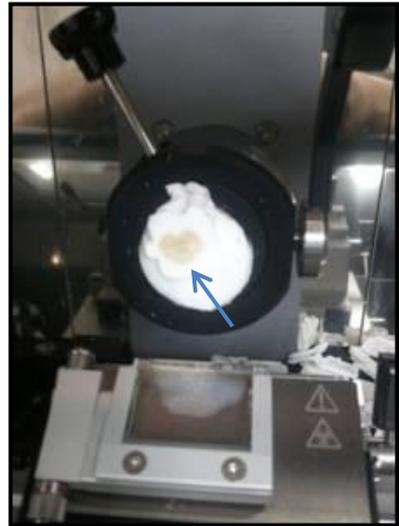


*Fig. III.3. Cerebro de rata Wistar adulta en el que se ha seccionado el polo frontal (flecha)*

Una vez ya teníamos el cerebro congelado y preparado adecuadamente se colocaba en el molde del micrótopo Microm HM 550 para proceder a realizar los cortes seriados como se aprecia en las siguientes figuras (Fig. III.4a. y Fig. III.4b):



**Fig. III.4a** *Microtomo de congelación Microm HM 550*



**Fig. III.4b.** *Cerebro de rata Wistar congelado preparado para realizar los cortes histológicos seriados (flecha)*

Se hicieron secciones coronales cerebrales longitudinales , en sentido anteroposterior cerebral, de 50 micras de espesor de manera seriada.

Se disponían de manera seriada un primer corte histológico en un portaobjetos y los cuatro siguientes seriados correspondientes en placas de Petri con tampón fosfato (como se aprecia en la Fig. III.5.). De manera que se

procedía a la tinción con la Técnica de Nissl para el corte del portaobjetos y la tinción con la Técnica de NADPH-d para los cuatro cortes del pocillo. Así pues, posteriormente se realizaba la localización anatómica gracias a la tinción de Nissl y de esta manera en esta misma localización anatómica se situaban los cortes con NADPH-d que le correspondían.

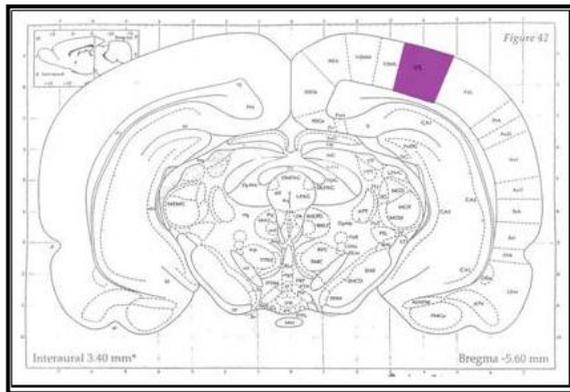


**Fig. III.5.** *Criostato que en la parte superior se observan los portaobjetos para la tinción de Nissl y las placas de Petri correspondientes (con cuatro cortes histológicos en cada de una de ellas en tampón fosfato previo a la tinción de NADPH-d)*

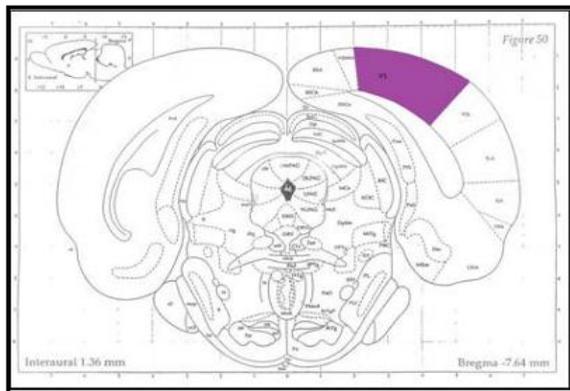
### **3.1.4.-Atlas de estereotaxis y quimioarquitectónico del cerebro de rata de Paxinos**

Hemos utilizado estos atlas para la localización de las áreas a estudio, ya que los esquemas y las tinciones están referenciados con respecto al punto Bregma craneal, situándonos en la zona adecuada.

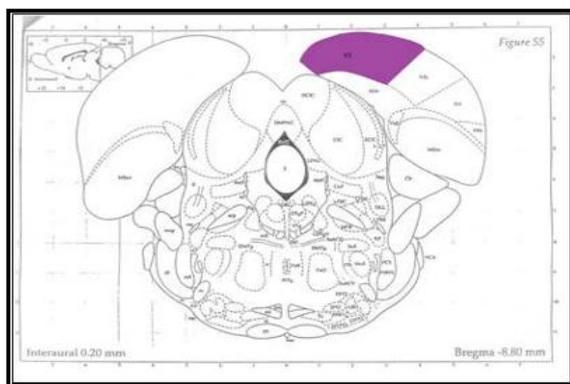
A continuación se exponen tres esquemas de Bregmas del atlas de estereotaxis de Paxinos y cols. (1999) en los que se aprecia en el primero de ellos: Bregma 5.6 (Fig. III.6.) que es donde empieza el área visual primaria y Bregmas de regiones posteriores cerebrales (Fig. III.7. y Fig. III.8.) en donde se aprecian los cambios evolutivos de dicha área:



**Fig. III.6.** Bregma 5.60



**Fig. III.7.** Bregma 7.64



**Fig. III.8.** Bregma 8.80

## **3.2. METODOLOGÍA**

### **3.2.1. TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOQUÍMICA**

#### **3.2.1.1. Técnica histoquímica para optimizar la localización del área visual primaria en el cerebro de la rata Wistar: Tinción de Nissl**

La tinción de Nissl es una técnica gracias a la cual se observan estructuras de núcleos y áreas cerebrales con bastante precisión, así pues, dicha tinción nos permitía cotejar cada corte teñido con Nissl con el mapa de Paxinos y así se localizaba el área a estudio con mayor exactitud. De esta manera, localizábamos el Bregma en el que nos encontrábamos con la tinción de Nissl y a éste Bregma le correspondía también los cuatro cortes siguientes seriados que se habían teñido con NADPH-d.

Para la tinción de Nissl el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1.** 3 minutos en alcohol 70°
- 2.** 15 segundos en H<sub>2</sub>O destilada
- 3.** 2-10 minutos en violeta de cresilo en solución acuosa al 1% (en nuestras tinciones: 3-4 minutos)
- 4.** 30 segundos en H<sub>2</sub>O destilada—2 repeticiones

**5.** 1 minuto en alcohol 50°

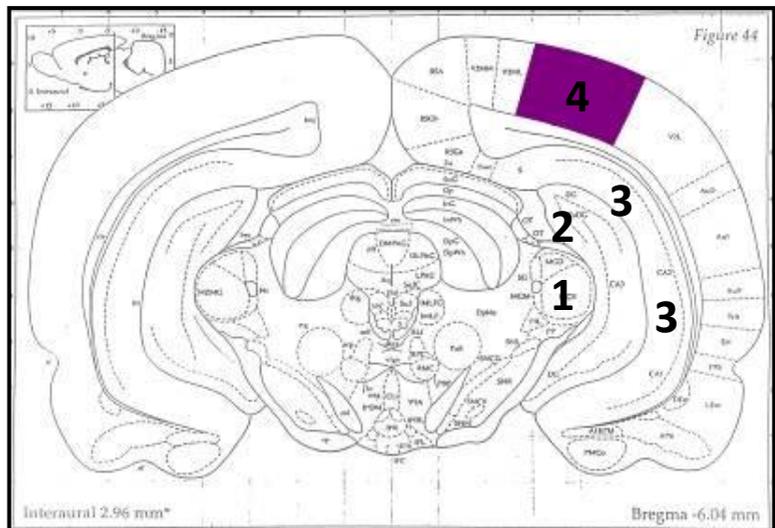
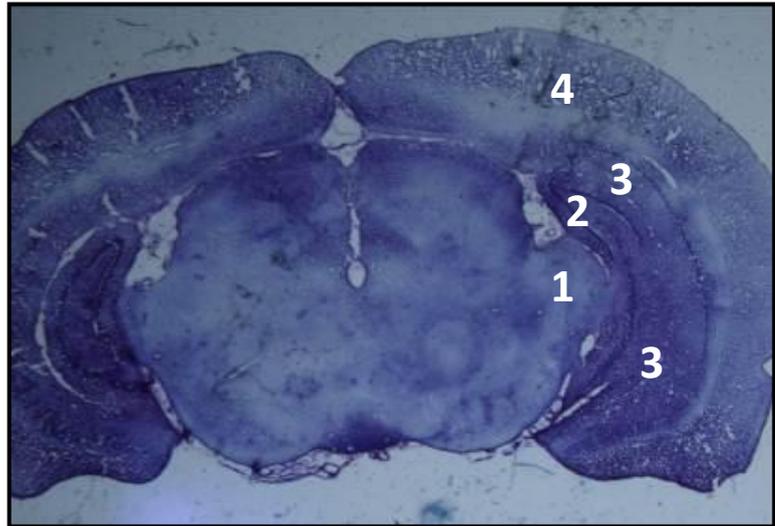
**6.** 1 minuto en alcohol 70°

**7.** Un baño en alcohol 96° + ácido acético 1% (unas gotas), durante un tiempo variable (a ojo), con lo que se consigue diferenciar los somas neuronales.

**8.** 2 minutos en alcohol 100°

**9.** Un baño de cloroformo, durante un tiempo variable (a ojo), para diferenciar la sustancia blanca.

En las figuras siguientes (Fig. III.9. y Fig. III.10.) se aprecia la comparativa entre el corte histológico de cerebro de rata Wistar teñido con Nissl en el que se pueden localizar diferentes áreas cerebrales y el esquema de Paxinos en donde también las encontramos, de esta manera se ha localizado el Bregma 6.04 en este caso:



**Fig. III.9. (arriba) y Fig. III.10. (debajo)** Corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta teñido con Nissl en el que se aprecia el Bregma 6.04 y esquema de Paxinos en los que se aprecian las áreas cerebrales:

1. Núcleo geniculado medial
2. Gyrus dentado
3. Hipocampo
4. Corteza visual primaria

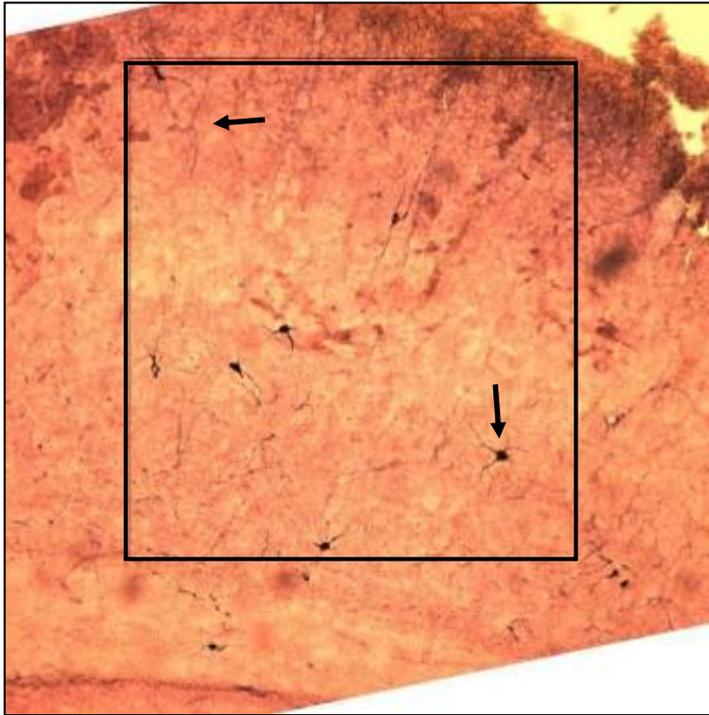
### 3.2.1.2. Técnica histoquímica para optimizar la localización de las células NADPH-diaforasa a estudio: Tinción de la NADPH-diaforasa

Una vez obtuvimos los cortes de cerebro y se procedió a localizar las zonas de interés con la técnica anterior, comenzamos con el proceso de tinción para la NADPH-diaforasa y así pudimos localizar las células que contenían dicha enzima. Se utilizó la técnica de tinción de Ellison y cols. (1987) que a su vez es una modificación de la utilizada por Scherer-Singler y cols. (1983). Dicha técnica consiste en incubar los cortes obtenidos en una solución de NADPH durante aproximadamente 1 hora a 37° y agitación continua. La solución de NADPH contiene Tritón x-100 al 0.5%, Tetrazolio nitroblue 0.08 mM y B-NADPH 1mg/ml. Tras la incubación se observa un color **azulado**. Posteriormente se procede al lavado con tampón fosfato hasta que el líquido esté transparente. A continuación se detalla el proceso:

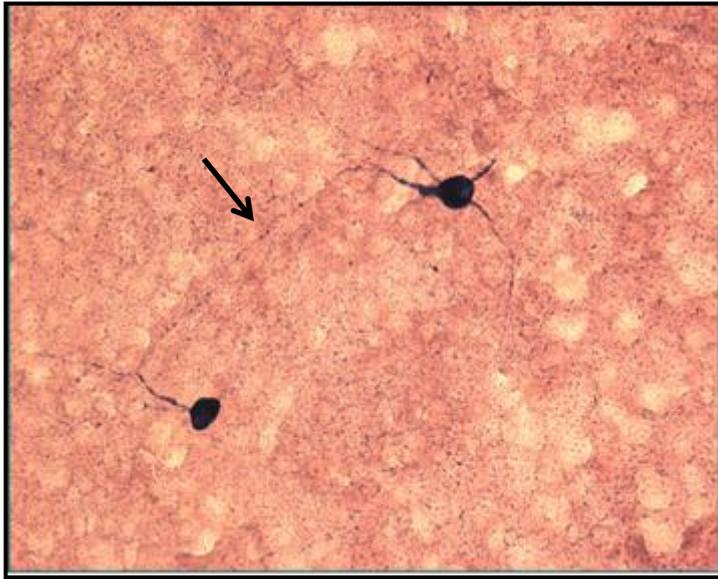
Técnica histoquímica de NADPH-diaforasa: Según método Ellison y cols. (1987).

1. Secciones incubadas 2h a 37°C en un medio con Tampón Tris-HCl pH: 8 0,1M con 0,8% Tritón X-100, Malato monosódico 8mM, NADPH 1mM y NTB 0,8mM.
2. Lavar con Tampón Fosfato 1, 125M --- repetir 3 veces.
3. Montar en portas gelatinizados y dejar secar.

En las imágenes adjuntas se aprecia el área a estudio con las neuronas y axones NADPH-diaforasa en la Fig. III.11. y en la Fig. III.12. se aprecian dos neuronas NADPH-diaforasa y su sinapsis:



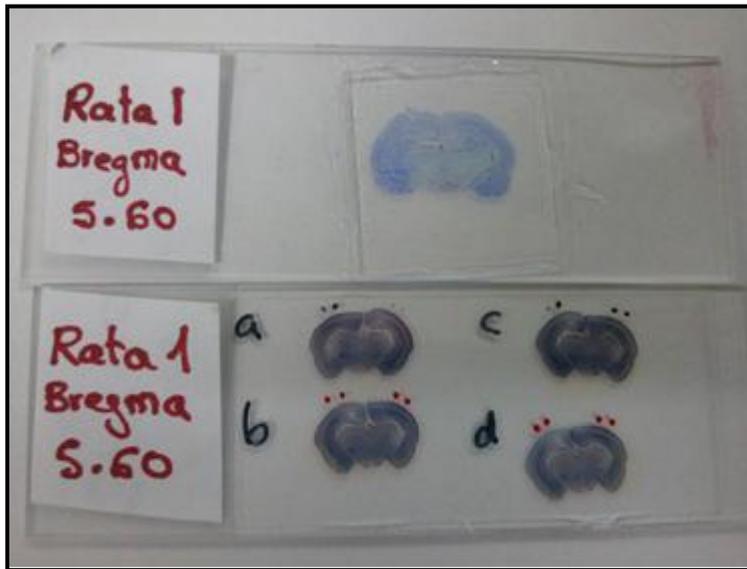
**Fig. III.11** Área visual primaria de cerebro de rata Wistar teñido con NADPH-d con la zona rectangular marcada en zona central de V1. Se realizó el conteo de neuronas y axones NADPH-d del interior de dicha área (flechas)



**Fig. III.12.** *Dos neuronas NADPH-diaforasa en cerebro de rata Wistar adulta teñido con NADHP-d y su sinapsis (flecha)*

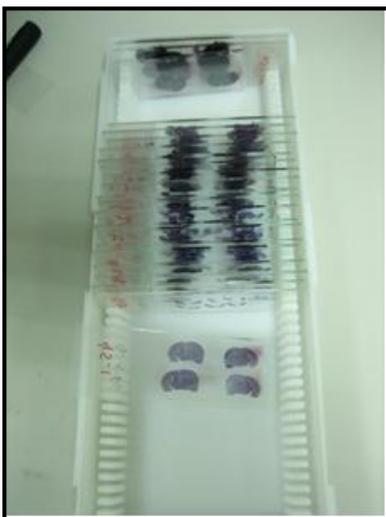
Una vez obtenidos los cortes histológicos teñidos con NADPH-d se enumeraron de manera seriada con la correspondencia con su portaobjetos de tinción de Nissl. Todos los cortes se codificaron de manera que cada portaobjetos podía localizarse tanto en Nissl como en NADPH-d y con el número correspondiente de la rata a la que pertenecían.

En la imagen adjunta (Fig. III.13.) se observan portaobjetos que corresponden al mismo Bregma, en el superior se observa la tinción de Nissl y en el inferior la tinción con NADPH-d con los cuatro cortes seriados consecutivos correspondientes:



**Fig. III.13.** Portaobjetos en imagen superior con tinción de Nissl y portaobjetos inferior con los cortes de cerebro de rata Wistar adulta, son cortes seriados consecutivos correspondientes a ese Bregma teñidos con NADPH-d

Así pues, en la imagen inferior (Fig. III.14.) se muestran en los portaobjetos las tinciones con NADPH-d desde el Bregma 5.6 hasta el área final cerebral en el que se aprecia la V1 de una rata Wistar:



**Fig. III.14.** Cortes histológicos seriados de cerebros de Rata Wistar adulta teñidos con NADPH-d

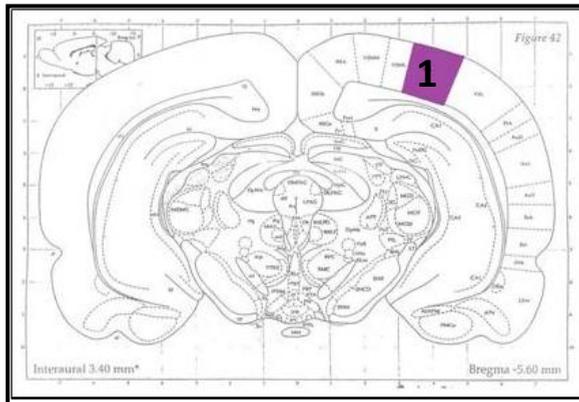
### **3.2.2. OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES**

Para la localización del corte teñido, utilizábamos un **microscopio NIKON SMZ 1500** (Fig. III.15. y Fig. III.18) mediante el cual podíamos ver el corte histológico en su totalidad y ubicarnos gracias a las estructuras cerebrales teñidas con Nissl en el Bregma 5.6. A partir de dicho Bregma seguíamos con los siguientes de manera seriada hasta el final de V1. Una vez garantizada la localización, identificamos las células NADPH-d con los cortes correspondientes a cada Bregma. Así pues, mediante este microscopio teníamos una imagen macroscópica del corte y pudimos ir codificando cada corte con cada Bregma.

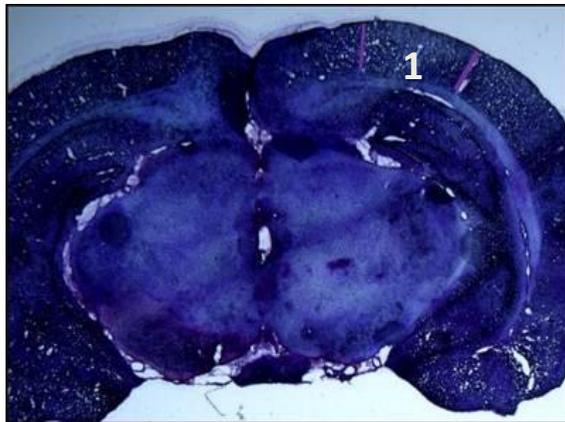


**Fig. III.15.** Microscopio NIKON SMZ 1500

La imagen siguiente superior (Fig. III.16.) corresponde a un esquema a nivel del Bregma 5.6 donde empieza el área visual primaria; la inferior (Fig. III.17.), mediante la técnica de Nissl, al área señalada en el mapa de manera que tenemos localizada anatómicamente el área de nuestro corte histológico a estudiar.



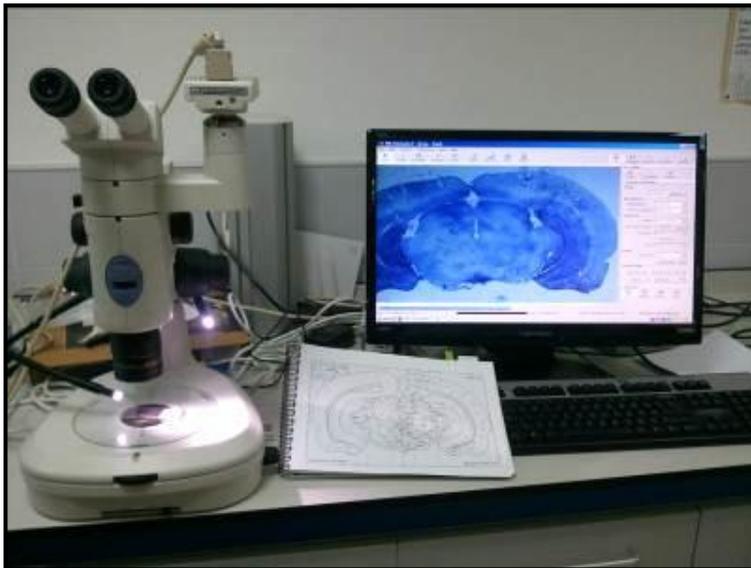
**Fig. III.16.** Bregma 5.60 del mapa cerebral de rata de Paxinos donde comienza el área visual primaria (1)



**Fig. III.17.** Tinción de Nissl de corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta con el área visual primaria destacada (1) en el Bregma 5.60 del mapa de cerebro de rata de Paxinos

Una vez ya teníamos todos los cortes codificados con su Bregma correspondiente utilizábamos otro microscopio de mayor aumento para ir obteniendo las imágenes histológicas donde realizar el estudio de las neuronas NADPH-d.

Para la obtención de dichas imágenes, se utilizó el microscopio LEICA DMLB (Fig. III.19.) mediante el cual se obtuvieron fotografías con aumento de **x 10** de la zona central del área V1 de manera sistematizada en todos los cortes analizados. Una vez obtuvimos las imágenes procedimos a su procesamiento y análisis.



**Fig. III.18.** Microscopio NIKON SMZ 1500 y localización del Bregma del corte histológico teñido con Nissl con el mapa de cerebro de rata de Paxinos

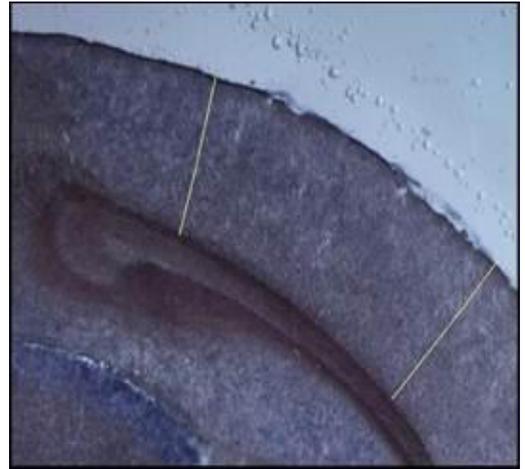


**Fig. III.19.** *Microscopio LEICA DMLB en el que se obtenían las imágenes del área visual primaria del cerebro de rata Wistar con la tinción de NADPH-d (aumento X 10)*

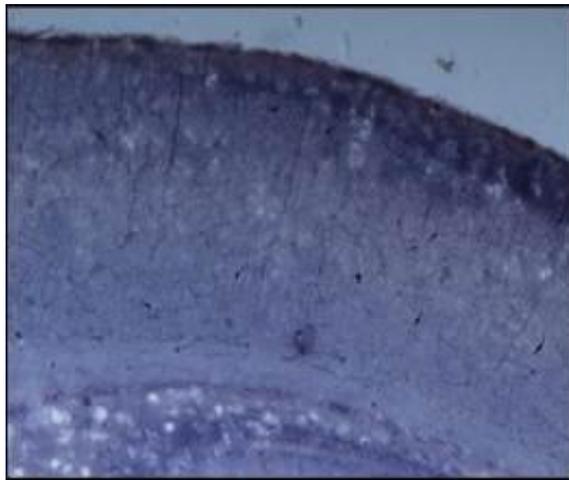
Con el microscopio Leica DMLB obteníamos las imágenes que correspondían al área visual primaria, se localizaba dicha área cerebral y se hacía una foto con aumento de x10 de la zona central de dicha área en cada corte histológico (siempre del lado derecho cerebral para que las muestras fuesen comparativas entre ellas). En las imágenes siguientes se observan diferentes ampliaciones de un mismo corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d (Fig. III.20.; Fig. III.21. y Fig. III.21.):



**Fig. III.20.**



**Fig. III.21.**



**Fig. III.22.**

**Fig. III.20.; Fig. III.21. y Fig. III.22.** Diferentes ampliaciones del mismo corte cerebral de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d obtenidos con el microscopio LEICA DMLB. En las figuras III.20. y III.21. se ha marcado el área que corresponde al área visual primaria. En la figura inferior Fig. III.22. el aumento es X 10 y corresponde al área visual primaria

### **3.2.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES**

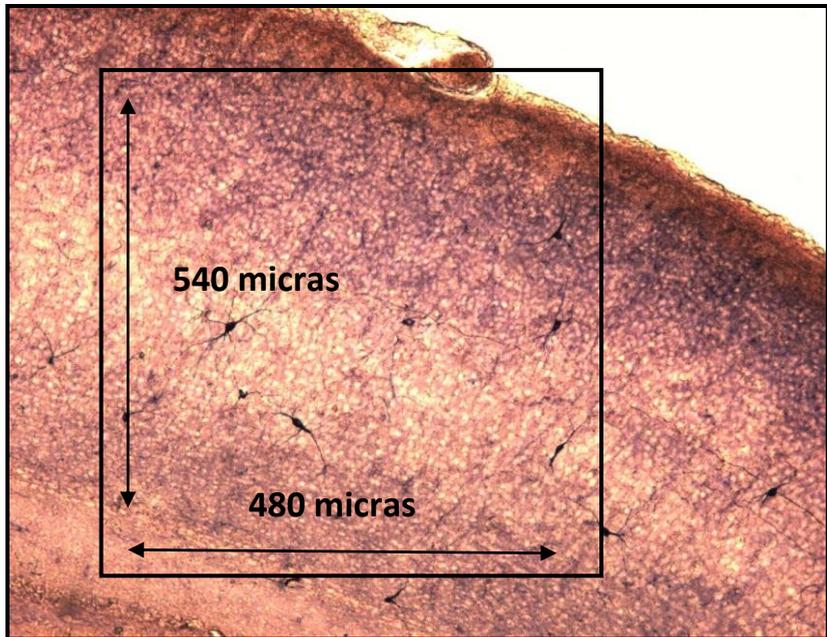
Todas las imágenes se obtuvieron también de manera seriada y fueron **codificadas** con sus portaobjetos correspondientes. Como cada uno de los portaobjetos de NADPH-d ya estaban identificados con el Bregma correspondiente, nos apoyábamos con copias de las láminas del atlas estereotáxico de Paxinos.

Se localizaba el área V1 en cada corte y se fotografiaba la zona central de la misma con un microscopio Leica DMLB con un aumento de **x 10**.

Como los límites de la V1 en la rata no son precisos, para hacer el recuento de las neuronas NADPH-d, se marcó un área constante rectangular (Fig. III.23.) en todos los cortes que medía 480 micras x 540 micras, con una superficie constante de 259.000 micras al cuadrado, o sea, una superficie de 0.259 milímetros cuadrados, para llegar a todas las capas de la corticales dentro de V1, independientemente del tamaño del cerebro (ya que utilizábamos ratas de diferentes edades y los cerebros tienen diferentes tamaños) y del tamaño del área V1 en cada corte (el tamaño de V1 varía a lo largo de la corteza cerebral en una misma rata, ver Fig. III.24. y Fig. III.25.).

De esta manera, se podía posteriormente hacer un contaje neuronal en el interior de dicha área rectangular marcada (480 x 540 micras) en el que los resultados fueran comparables entre todas las muestras. Así pues, las

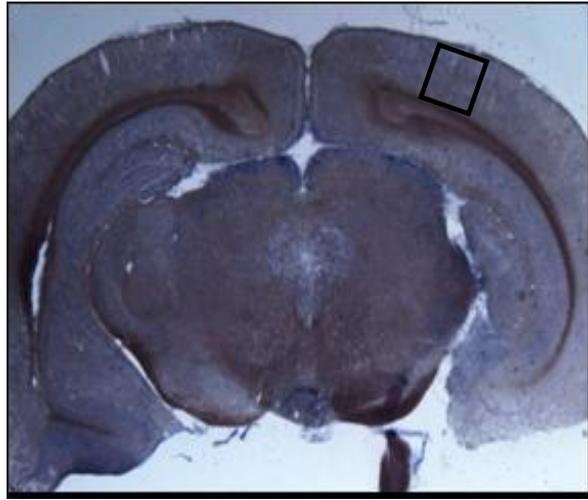
**densidades poblacionales neuronales** que se obtuvieron fueron comparables.



**Fig. III.23.** Área rectangular constante de 480 x 540 micras marcada en cada imagen obtenida con el microscopio LEICA DMLB (aumento x 10), en la zona central del área V1 de corte histológico cerebro de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d

El conteo se realizó siempre en el mismo hemisferio cerebral (en el derecho) y en el mismo punto (zona central del área V1) para evitar posibles efectos de laterización que pudiesen sesgar los resultados.

En las imágenes siguientes (Fig. III.24. y Fig. III.25) se aprecian cortes de diferentes tamaños de la misma rata Wistar adulta según el nivel de la sección coronal realizada, por ello se midió un área constante en todos los cortes para evitar el sesgo de diferentes tamaños del área V1 en una misma rata. Son cortes histológicos cerebrales seriados en sentido anteroposterior que muestran el diferente tamaño de V1 según la sección, siendo mayor el área V1 en las secciones finales en sentido anteroposterior cerebral. Así pues, se midió el área constante central rectangular de 480 x 540 micras en el área central de V1 de cada corte, para poder tener muestras comparables entre ellas.

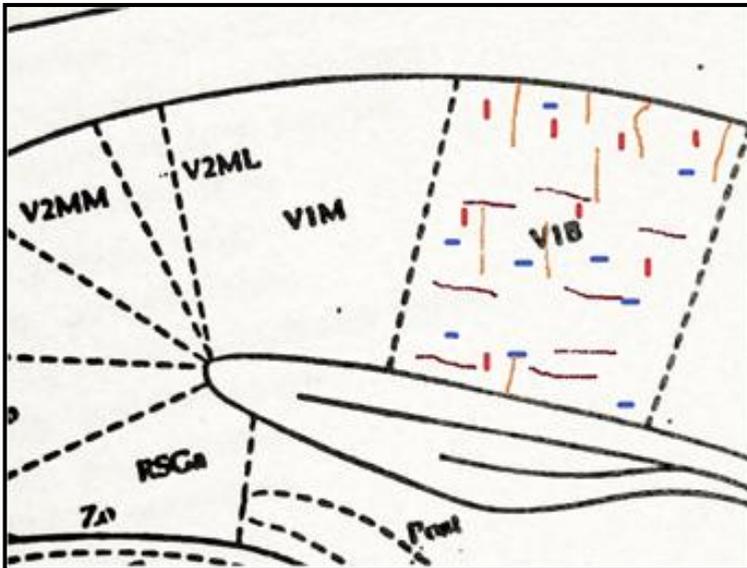


**Fig. III.24.** Corte cerebral de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d correspondiente al Bregma 5.60 donde comienza el área visual primaria ó V1 (rectángulo) en sentido anteroposterior cerebral coronal longitudinal



**Fig. III.25.** Corte cerebral de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d correspondiente al Bregma 7.30 en áreas finales del área visual primaria ó V1 (rectángulo) según cortes seriados cerebrales en sentido anteroposterior coronal longitudinal. Este corte es de la misma rata que el corte de la Fig. III.24. Se aprecian las diferentes dimensiones del área V1 según el nivel de corte histológico si comparamos ambas figuras

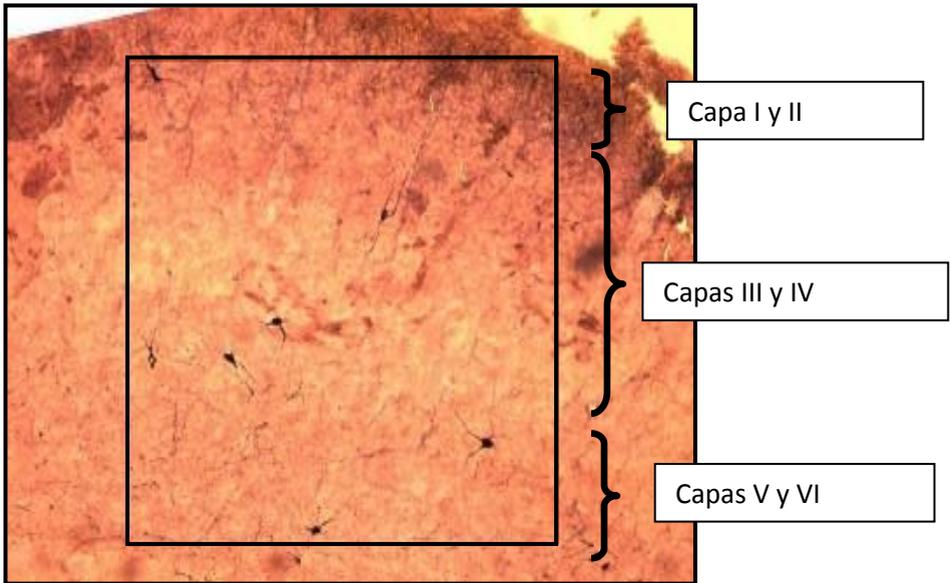
Las neuronas fueron contabilizadas y ubicadas en cada capa de la corteza visual y además se detalló la orientación de cada neurona según si eran verticales u horizontales dentro del área estudiada respecto a la superficie de la corteza cerebral. Para ello, utilizamos un esquema para cada corte (Fig. III.26.), en el que a manera de gráfico se marcaba la situación y la posición de cada neurona. Aprovechábamos este mismo esquema para representar también los axones neuronales, tanto la situación y posición de los mismos.



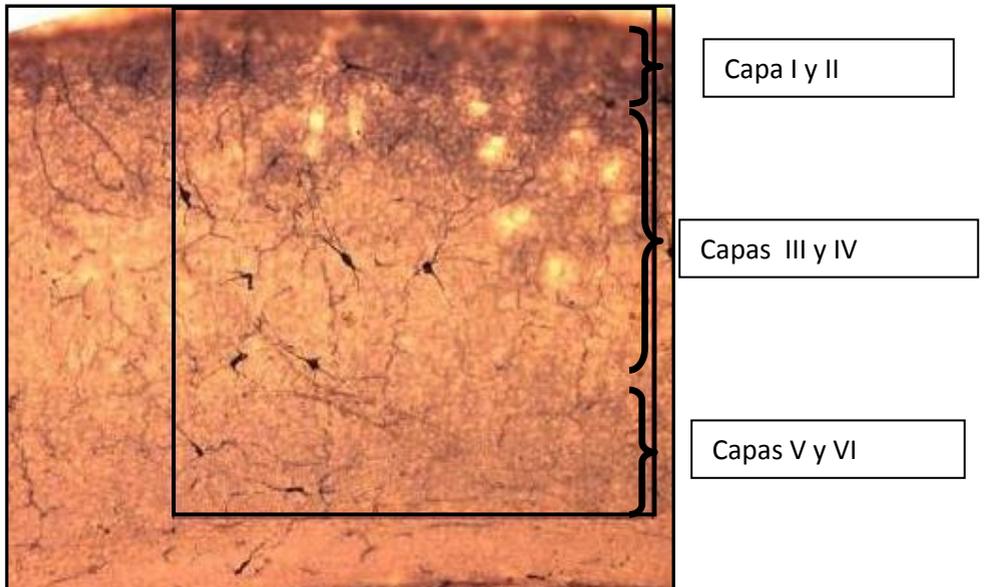
**Fig. III.26.** Esquema de un corte para contabilizar neuronas NADPH-d siendo coloreadas de azul las horizontales y de rojo las verticales. Los axones NADPH-d también se contabilizaron y se colorearon de amarillo los verticales y de marrón los horizontales. Se contabilizaron sólo los que se encontraron dentro del área rectangular de medición constante de 480 x 540 micras, en la zona central de V1 de todos los cortes histológicos de cerebro de ratona Wistar teñidos con NADPH-d

En el sistema de recuento de perfiles neuronales se consideró aquella neurona que tuviera todo el soma en la capa correspondiente desechando aquellos elementos que no siguieran este criterio. Los axones que hemos contado, los identificamos siguiendo los criterios de la definición de axón. Se consideraron la capa I y la capa II por un lado como un primer grupo, un segundo grupo con las capas III y IV; por último, el tercer grupo eran las capas V y VI como se aprecia en las imágenes inferiores (Fig. III.27.Superior. y Fig. III.27.Inferior). De esta manera, se contabilizaron las neuronas que pertenecían a cada grupo y se especificó su orientación.

Cuando se tenía el recuento de todos los cortes de una rata, contábamos el total de neuronas y axones horizontales por grupo de capas; lo mismo hacíamos con las neuronas y axones verticales. Este recuento total lo transcribíamos a una hoja de cálculo Excell para el estudio estadístico (ver Tablas de recuentos absolutos en Resultados).



**Fig. III.27.Superior** y **Fig. III.27.Inferior** Zona central del área V1 marcada con el área rectangular constante de conteo con neuronas y axones NADPH-d. Se aprecia la clasificación de las capas de la corteza cerebral en tres grupos para facilitar el conteo de los elementos



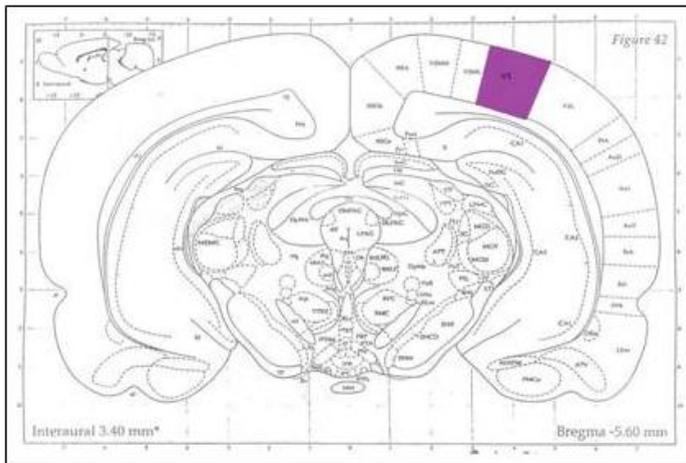


# **4. Resultados**

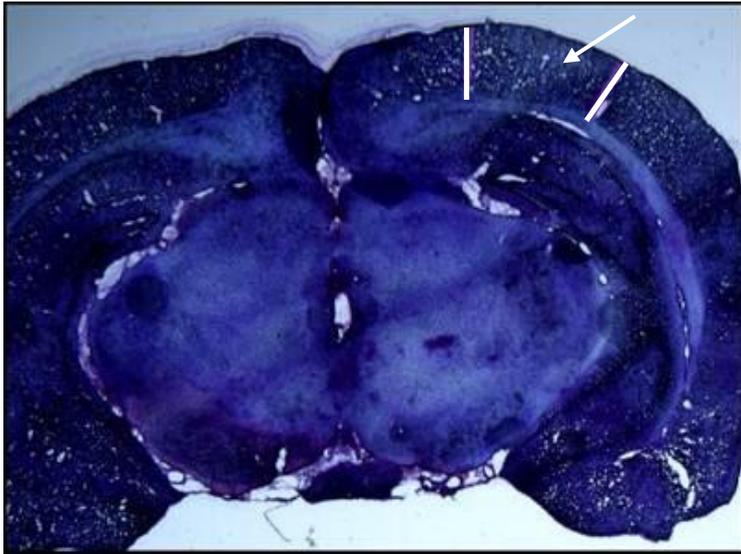


## **Breve introducción a los resultados generales del estudio**

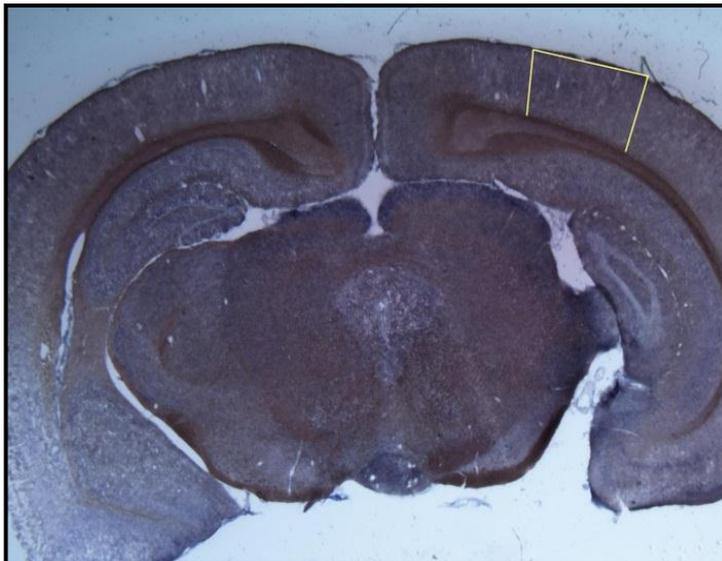
Con la metodología expuesta en el capítulo correspondiente hemos localizado todos los cortes cerebrales obtenidos con el atlas topográfico del cerebro de rata de Paxinos. En este atlas hemos estudiado el área visual primaria que comienza en el Bregma 5.60 (Fig. IV.1.) y continua hasta el final de la corteza, es decir comienza en este bregma y luego el área visual nos aparece en todos los cortes histológicos hasta que termina el área occipital. Así pues, a cada corte histológico le hemos asignado un esquema del atlas de Paxinos (Fig. IV.2a., Fig. IV.2b. y Fig. IV.3.) de manera que hemos realizado el conteo de neuronas y axones de toda el área visual en cada cerebro localizando en todo momento el Bregma en el que nos encontrábamos.



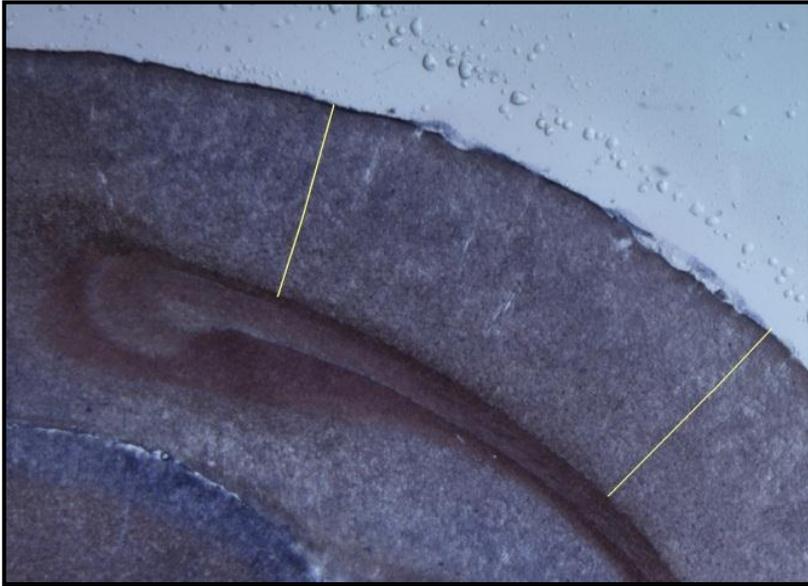
**Fig. IV.1.** Bregma 5.60 del mapa topográfico del cerebro de rata de Paxinos. Se aprecia el área V1 coloreada



**Fig. IV.2a.** Bregma 5.60 de corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta teñido con la técnica de Nissl para la localización anatómica. Se aprecia el área V1 marcada con dos líneas y una flecha



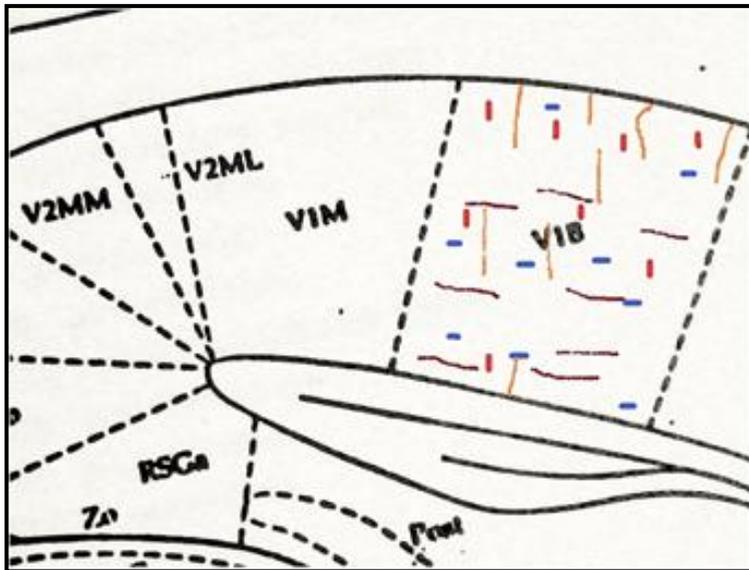
**Fig. IV.2b.** Bregma 5.60 en corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta teñido con la técnica histoquímica NADHP-d. Se marca el área V1 en el rectángulo



**Fig. IV.3.** Ampliación del corte histológico de cerebro de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d en el que se aprecia el área visual primaria (V1) entre las dos líneas marcadas en el Bregma 5.60

En cada corte histológico, tras localizar el área visual y el Bregma, hemos utilizado un área constante en todas las muestras de **480 x 540 micras** que hemos marcado en la zona central del área visual de cada uno. Posteriormente, hemos realizado el contaje de neuronas y axones que están en el interior de dicha área, por tanto, nuestros resultados son de “**densidad neuronal o axonal**”. Esta área constante nos permitió que los resultados que obtuvimos en las muestras de diferentes tamaños cerebrales y en diferentes Bregmas de un mismo cerebro fueran comparables entre sí. En cada esquema hemos marcado simbólicamente las neuronas y axones

encontrados así como la orientación y su posición la corteza, de modo que esta metodología nos facilitó el recuento total y el estudio de la distribución de los elementos encontrados (Fig. IV.4.).



**Fig. IV.4.** Esquema para el marcado de los elementos encontrados en el área de recuento: neuronas horizontales en azul, neuronas verticales en rojo, axones verticales en amarillo y axones horizontales en marrón

En cuanto al análisis de los datos hallados, en cada corte histológico hemos observado el hecho de que las neuronas NADPH-d las encontrábamos dispuestas según su soma, unas en posición vertical y otras en posición horizontal respecto a la superficie de la corteza. De igual forma, en los axones hemos observado también que se encontraban en disposición vertical o en horizontal respecto a la corteza. Por tanto, se diferenció el contaje de neuronas

y axones según si su orientación era vertical u horizontal (“**V**” son verticales y “**H**” horizontales).

Como hemos comentado en el apartado de “Material y Métodos” las capas se han dividido en tres bloques para facilitar su estudio por capas corticales. Así pues, por una lado están las “**Capas 1 y 2**” de la corteza con su contaje en común configurando el primer bloque de capas corticales más superficiales, por otro lado, las “**Capas 3 y 4**” (configurando el segundo bloque de capas corticales medias) y finalmente, el último bloque estudiado es el de las “**Capas 5 y 6**” de la corteza visual, que son las más profundas.

En cuanto a la edad de las ratas para ver los cambios evolutivos en el tiempo, hemos hecho el estudio en tres estadios de edad de manera que, “**T1**” corresponde a las ratas de una semana de vida (periodo postnatal), “**T2**” corresponde a ratas de tres meses de vida (que podemos considerar adultas) y “**T3**” son las ratas de un año de vida (consideradas viejas). De esta manera hemos analizado en primer lugar cada estadio por separado y posteriormente hemos cruzado los datos para ver las diferencias entre ellos y poder ver los cambios evolutivos de la densidad neuronal y axonal NADPH-d con la edad.

Una vez realizado el recuento de las preparaciones histológicas hemos obtenido una serie de datos que hemos dispuesto en tres tablas (una por cada estadio de edad) y en cada una de ellas se ha efectuado el estudio cuantitativo y distributivo de densidad neuronal y axonal en las diferentes capas de la corteza visual V1. Con los datos obtenidos se ha hecho el **recuento total** de

cada elemento (neurona o axón vertical u horizontal) en términos absolutos en cada bloque de capas corticales y posteriormente se ha calculado la **media con su desviación estándar**.

Para facilitar la exposición de los datos obtenidos hemos utilizado dos tipos de tablas que explicamos a continuación:

• **Tablas de frecuencias absolutas:**

Son tablas que recogen el número de veces que se ha observado un número determinado de neuronas o axones (son el encabezado de columna) en cada uno de los estadios temporales. Los datos aparecen desglosados por orientación (neuronas o axones horizontales y verticales) y el recuento total. La última columna de estas tablas corresponde al número observado total de neuronas o axones en cada caso, no a la suma de frecuencias.

• **Tabla de frecuencias relativas (%):**

Son tablas que recogen los datos que se obtienen en referencia al conjunto global de neuronas o axones observados. En cada caso se ha dividido el número de neuronas o axones observados por el total de neuronas o axones correspondiente. La última columna de estas tablas corresponde a la media y desviación estándar de los datos.

Además, en el segundo apartado de Resultados en el que se analizan los elementos estudiados en los tres estadios de edad se describen los datos utilizando gráficas de diagramas de barras y densidades:

• **Diagramas de Barras:**

En estos diagramas el eje de abscisas corresponde al número de neuronas o axones que se observan y el eje de ordenadas corresponde al número de individuos (ratas).

• **Diagramas de líneas de densidad:**

En estos diagramas se representan las medias de densidad (tasa porcentual) estimada del recuento de neuronas o axones

En resumen, en la primera parte de Resultados se analizan los datos obtenidos en cada estadio según los recuentos totales y las medias con sus desviaciones estándar encontradas. En la segunda parte, hemos analizado los resultados obtenidos teniendo en cuenta cada elemento por separado, neuronas o axones, en los tres estadios de edad. Y posteriormente, en la tercera parte, hemos utilizado el **“Test de Wilcoxon”** en los datos del estudio evolutivo para *comparar a pares los diferentes estadios* de edad de la rata. De esta manera hemos comparado neuronas y axones por diferentes capas entre dos edades distintas para ***ver los cambios que existían en relación a la edad y su significancia estadística*** (es decir, la ***confianza que tenemos en que las diferencias encontradas sean***

**ciertas**). Por último, en el cuarto apartado de Resultados, hemos querido explicar el estudio morfológico que hemos observado en las muestras obtenidas.

## 4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA ESTADIO DE EDAD

### 4.1.1. Resultados en ratas Wistar de una semana de vida o T1:

En las ratas de una semana de vida hemos realizado el conteo de neuronas y axones en los tres bloques de capas corticales y a continuación expondremos los resultados de la densidad de ambos elementos en el área estudiada.

En el conteo total en términos absolutos de neuronas hemos hallado 544, de las cuales 235 eran neuronas horizontales y 309 eran verticales en su orientación respecto a la superficie de la corteza cerebral (ver Tabla IV.1., en el encabezado se recoge el número de veces que se observa un número determinado de neuronas y en la columna final el recuento total en términos absolutos).

Neuronas T1																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL				
Horizontales	3	8	12	9	17	6	4	4	1	2	0	235				
Verticales	1	3	2	14	13	12	10	4	4	2	1	309				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TOTAL
Rec.TOTAL	0	0	1	2	8	12	6	9	8	6	5	3	2	2	2	544

**Tabla IV.1.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en global en T1

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Además, hemos calculado las medias con sus desviaciones estándar de los datos obtenidos de manera que, la media de neuronas horizontales en V1 fue de  $3.56 \pm 2.11$  y la media con su desviación de las verticales fue de  $4.68 \pm 2.05$ . Por último, en el contaje global de neuronas tanto de verticales como horizontales la media fue de  $8.24 \pm 2.84$  (ver Tabla IV.2.).

Neuronas Horizontales (%)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	4.5	12.1	18.2	13.6	25.8	9.1	6.1	6.1	1.5	3	$3.56 \pm 2.11$

Neuronas Verticales (%)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
T1	15	4.5	3	21.2	19.7	18.2	15.2	6.1	6.1	3	1.5	$4.68 \pm 2.05$

TOTAL Neuronas (%)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	$\bar{x} \pm s$
T1	0	0	1.5	3	12.1	18.2	9.1	13.6	12.1	9.1	7.6	4.5	3	3	3	$8.24 \pm 2.84$

**Tabla IV.2.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas en global en T1

Así pues, podemos afirmar que según nuestras observaciones, globalmente, en las **ratas de una semana de vida existe una mayor densidad poblacional neuronal de neuronas verticales NADPH-d que de neuronas horizontales** (Fig. IV.5. y Fig. IV.6).

A continuación analizaremos qué distribución tienen estas neuronas NADPH-d en las diferentes capas de la corteza visual V1 diferenciando entre neuronas horizontales y verticales.

En primer lugar hablaremos de las neuronas horizontales en T1.

Según nuestras muestras histológicas hemos encontrado un total de 42 **neuronas horizontales NADPH-d en T1** en las capas superficiales de la corteza 1 y 2. En las capas 3 y 4 hemos hallado un total de 110 neuronas, y finalmente, en las capas profundas 5 y 6 hemos encontrado 83 (ver Tabla IV.3.). Posteriormente hemos calculado las medias con su desviación estándar de los datos encontrados obteniendo los siguientes resultados (ver Tabla IV.4.):

- En las capas 1 y 2 se encontró de media  $0.64 \pm 1.03$
- En las capas 3 y 4 la media fue de  $1.67 \pm 1.88$
- En las capas profundas 5 y 6 la media fue de  $1.26 \pm 1.35$

<b>Neuronas Horizontales T1</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
Capa 1/2	42	12	8	3	0	1	0	0	0	0	<b>42</b>
Capa 3/4	24	11	14	8	5	2	0	0	1	1	<b>110</b>
Capa 5/6	25	16	13	10	1	0	0	1	0	0	<b>83</b>

**Tabla IV.3.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas horizontales en T1 por capas corticales en V1

<b>Neuronas Horizontales (%) - Capa 1/2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	63.6	18.2	12.1	4.5	0	1.5	0	0	0	0	<b>0.64 ± 1.03</b>

<b>Neuronas Horizontales (%) - Capa 3/4</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	36.4	16.7	21.2	12.1	7.6	3	0	0	1.5	1.5	<b>1.67 ± 1.88</b>

<b>Neuronas Horizontales (%) - Capa 5/6</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	37.9	24.2	19.7	15.2	1.5	0	0	1.5	0	0	<b>1.26 ± 1.35</b>

**Tabla IV.4.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas horizontales en T1 por capas corticales en V1

Por tanto, según nuestros resultados podemos decir que **las neuronas NADPH-d horizontales en T1 son más numerosas en las capas medias y profundas de V1** (Fig. IV.7. y Fig. IV.8.).

En segundo lugar, exponemos los datos obtenidos en las neuronas verticales en T1.

Así pues, en el estudio de la distribución por capas de la corteza visual en el caso de las **neuronas verticales NADPH-d en T1** los resultados han sido distintos. En términos absolutos hemos encontrado en las capas 1 y 2 de la corteza un total de 140 neuronas verticales. En las capas 3 y 4 el total fue de 124 neuronas mientras que descendió en las capas profundas 5 y 6 a un total de 45 neuronas verticales (ver Tabla IV.5.).

A continuación se hizo el cálculo de las medias con sus desviaciones estándar de los datos obtenidos (ver Tabla IV.6.):

- En las capas 1 y 2 fue de  $2.12 \pm 1.7$
- En las capas 3 y 4 fue de  $1.88 \pm 1.36$
- En las capas 5 y 6 fue de  $0.68 \pm 0.91$

<b>Neuronas Verticales T1</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
Capa 1/2	11	15	18	10	6	3	2	0	1	0	140
Capa 3/4	10	19	19	8	7	3	0	0	0	0	124
Capa 5/6	36	19	8	2	1	0	0	0	0	0	45

**Tabla IV.5.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas verticales en T1 por capas corticales en V1

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 1/2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	16.7	22.7	27.3	15.2	9.1	4.5	3	0	1.5	0	<b>2.12 ± 1.7</b>

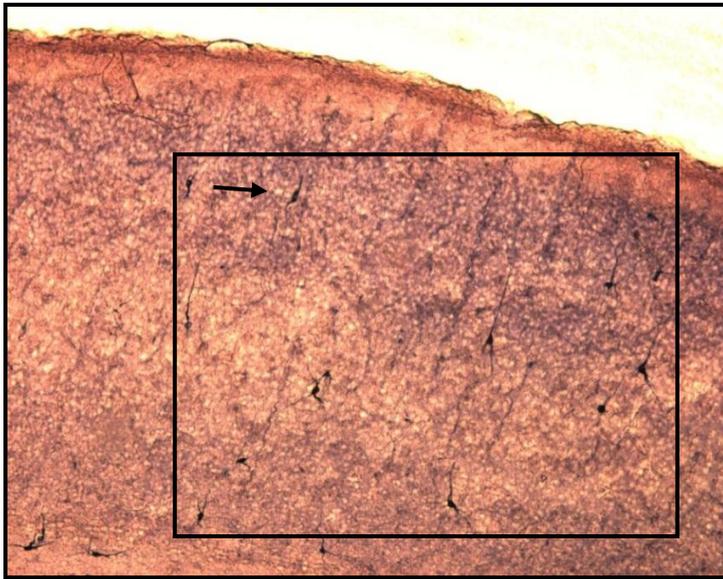
<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 3/4</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	15.2	28.8	28.8	12.1	10.6	4.5	0	0	0	0	<b>1.88 ± 1.36</b>

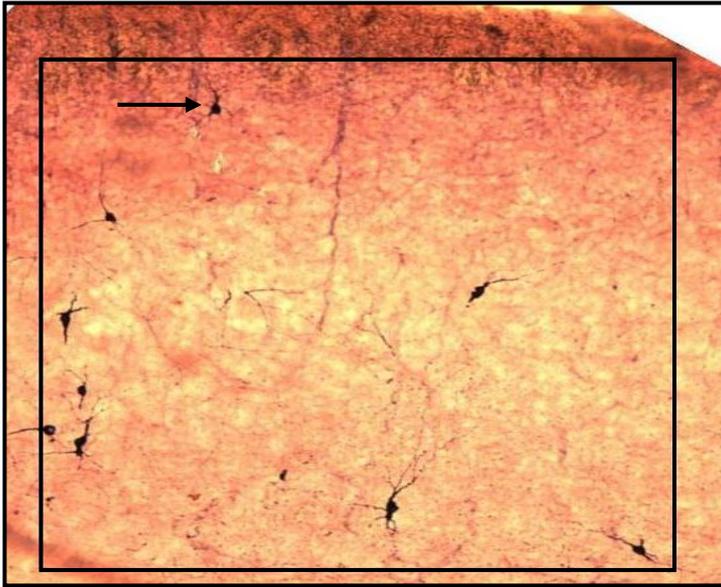
<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 5/6</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	54.5	28.8	12.1	3	1.5	0	0	0	0	0	<b>0.68 ± 0.91</b>

**Tabla IV.6.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas verticales en T1 por capas corticales en V1

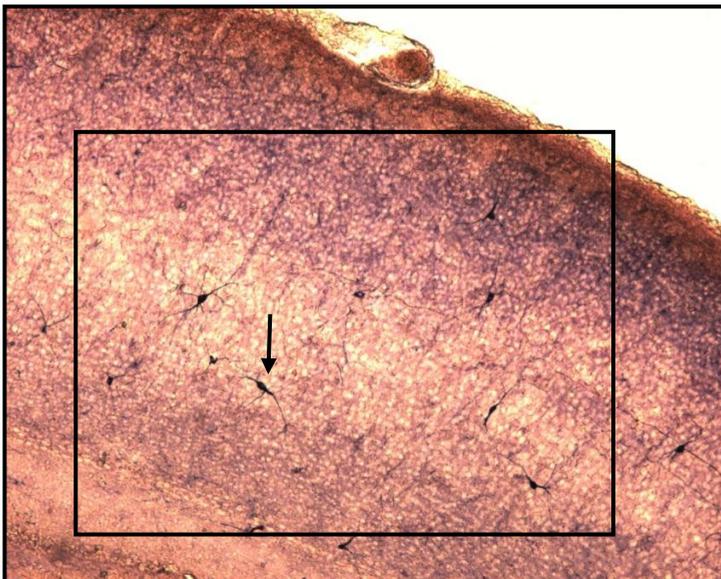
Por tanto, podemos afirmar que según nuestros datos las **neuronas verticales NADPH-d en T1 tienen una mayor densidad en su población en las capas más superficiales de la corteza mientras que descienden en capas medias para prácticamente existir muy pocas en las capas profundas de la corteza V1** (ver Fig. IV.5.).



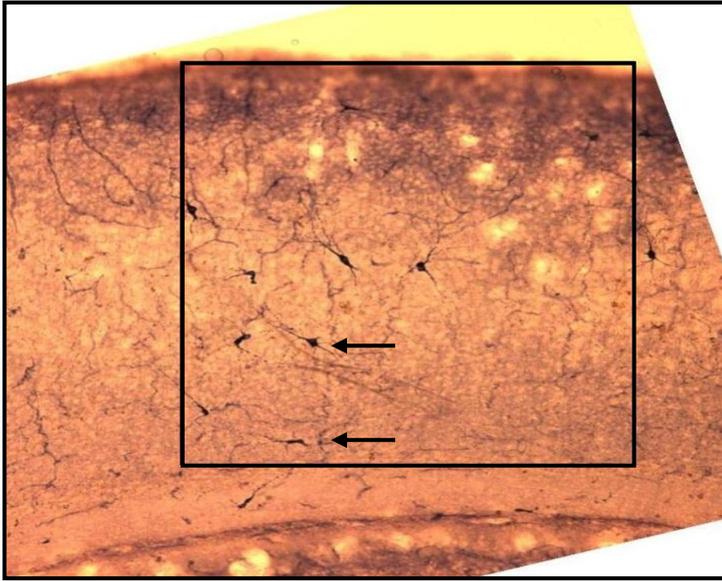
**Fig. IV.5.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecia la mayor densidad de neuronas verticales NADPH-d en V1 (flecha) y se distribuyen sobre todo en las capas corticales superficiales



**Fig. IV.6.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecia la mayor densidad de neuronas verticales (flecha) NADPH-d en V1



**Fig. IV.7.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian neuronas NADHP-d horizontales (flecha) en las capas medias y profundas de V1



**Fig. IV.8.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian neuronas NADPH-d horizontales (flecha) en las capas medias y profundas de V1

En segunda instancia, se ha hecho un estudio de la densidad de elementos axonales NADPH-d positivos de manera que se ha realizado un conteo en términos absolutos de su densidad globalmente y posteriormente hemos analizado su distribución por capas de la corteza (realizando la misma sistemática que hemos descrito anteriormente en neuronas).

Así pues, hemos hallado un total de axones horizontales de 204 mientras que de axones verticales se han hallado 790 siendo el conteo global de los mismos de 994 axones (ver Tabla IV.7.).

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

En el cálculo de las medias globales los resultados fueron en el caso de axones horizontales una media de  $3.09 \pm 2.93$  mientras que en axones verticales se la media resultó  $11.97 \pm 3.52$  siendo la media global de los mismos conjuntamente de  $15.06 \pm 4.58$  (ver Tabla IV.8.).

Axones T1																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL	
Horizontales	16	4	8	14	11	5	2	2	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	204	
Verticales	0	0	0	0	0	2	2	1	1	6	13	11	6	5	6	2	3	4	1	1	1	1	1	790	
TOTAL	0	0	0	0	0	1	0	3	6	4	5	7	9	5	7	5	1	2	2	2	2	2	2	994	

**Tabla IV.7.** Tabla de frecuencias absolutas de axones en global en T1

Axones Horizontales (%)																											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	$3.09 \pm 2.93$															
T1	24.2	6.1	12.1	21.2	16.7	7.6	3	3	1.5	3	1.5	$3.09 \pm 2.93$															
Axones Verticales (%)																											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	$11.97 \pm 3.52$				
T1	0	0	0	0	0	3	3	1.5	1.5	9.1	19.7	16.7	9.1	7.6	9.1	3	4.5	6.1	1.5	1.5	1.5	1.5	$11.97 \pm 3.52$				
TOTAL Axones (%)																											
	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	28	29	$15.06 \pm 4.58$	
T1	0	0	0	0	0	1.5	0	4.5	9.1	6.1	7.6	10.6	13.6	7.6	10.6	7.6	1.5	3	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5	$15.06 \pm 4.58$	

**Tabla IV.8.** Tabla de frecuencias relativas de axones en global en T1

Por tanto, podemos afirmar según nuestros datos que ***se encuentran numerosos elementos axonales en las muestras estudiadas pues son prácticamente el doble que las neuronas en la media de su densidad de población en T1***. Por otro lado, globalmente son ***más numerosos los axones verticales que los horizontales a los cuales prácticamente los cuadruplican en T1***.

A continuación analizamos la distribución por capas de los elementos axonales según su orientación.

En el caso de los ***axones horizontales NADPH-d en T1*** la distribución encontrada es la siguiente. En las capas 1 y 2 no se han encontrado axones horizontales en las muestras observadas en nuestro estudio. Por otro lado sí hemos encontrados en las capas medias 3 y 4 siendo un total de axones de 107 mientras que en las capas 5 y 6 el total fue de 97 (ver Tabla IV.9.).

En el cálculo de la media de densidad axonal los resultados fueron (ver Tabla IV.10.):

- En las capas 1 y 2 no se encontraron axones horizontales
- En las capas 3 y 4 la media con su desviación estándar fue  $1.62 \pm 2.89$
- En capas 5 y 6 la media fue de  $1.47 \pm 2.02$

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Axones Horizontales T1																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
Capa 1/2	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Capa 3/4	43	1	5	3	6	3	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	107
Capa 5/6	33	5	10	10	5	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97

**Tabla IV.9.** *Tabla de frecuencias absolutas de axones horizontales en T1 por capas corticales en V1*

Axones Horizontales (%) - Capa 1/2																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0

Axones Horizontales (%) - Capa 3/4																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	65.2	1.5	7.6	4.5	9.1	4.5	1.5	1.5	0	0	1.5	0	1.5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 1.67 ± 2.89

Axones Horizontales (%) - Capa 5/6																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	50	7.6	15.2	15.2	7.6	3	0	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 1.47 ± 2.82

**Tabla IV.10.** *Tabla de frecuencias relativas de axones horizontales en T1 por capas corticales en V1*

Por tanto, se puede afirmar que según nuestro estudio **no se observan axones horizontales NADPH-d en las capas superficiales de la corteza en V1 en T1**. Sin embargo, los **axones horizontales sí se encuentran en las capas medias y profundas de la corteza visual primaria aunque la media de densidad de población es pequeña en estas capas**.

En el estudio de la distribución por capas de la corteza de los **axones verticales NADPH-d en T1** los resultados hallados son los siguientes.

En términos absolutos, hemos hallado un total de 562 axones verticales en las capas 1 y 2, es decir, existe una población muy numerosa de los mismos en estas capas. Por otro lado, el contaje total en las capas 3 y 4 descendió a 195 axones y finalmente, en las capas profundas 5 y 6 el resultado que hallamos fue de 33 axones en total (ver Tabla IV.11.).

**Axones Verticales T1**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
Capa 1/2	0	0	0	0	1	2	12	12	10	11	12	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	562
Capa 3/4	22	1	5	8	9	8	9	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	195
Capa 5/6	55	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33

**Tabla IV.11.** *Tabla de frecuencias absolutas de axones verticales en T1 por capas corticales en V1.*

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

En el cálculo de las medias con sus desviaciones estándar encontramos que (ver Tabla IV.12.):

- En las capas 1 y 2 la media fue de  $8.52 \pm 3.01$
- En las capas medias 3 y 4 fue de  $2.95 \pm 2.51$
- En las capas 5 y 6 fue de  $0.5 \pm 1.26$

Axones Verticales (%) - Capa 1/2																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	0	0	0	0	15	3	18.2	18.2	15.2	16.7	18.2	3	1.5	0	0	0	0	1.5	0	0	15	0	1.5	$8.52 \pm 3.01$

Axones Verticales (%) - Capa 3/4																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	33.3	1.5	7.6	12.1	13.6	12.1	13.6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$2.95 \pm 2.51$

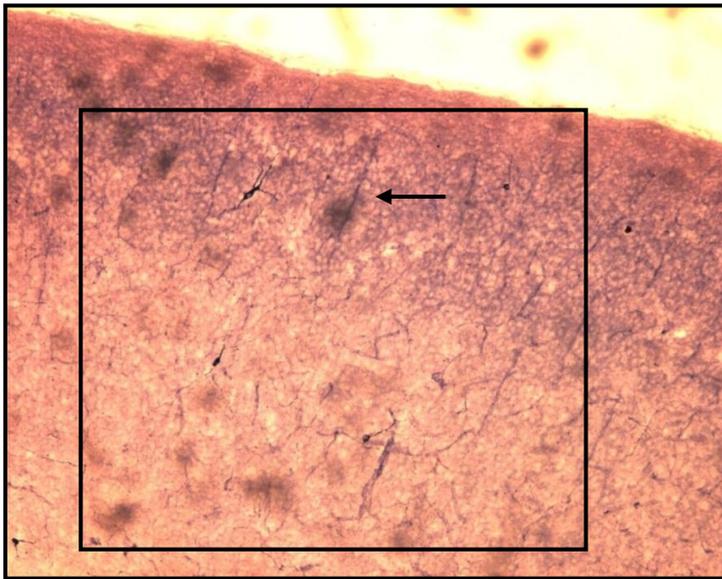
  

Axones Verticales (%) - Capa 5/6																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	83.3	3	3	4.5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$0.5 \pm 1.26$

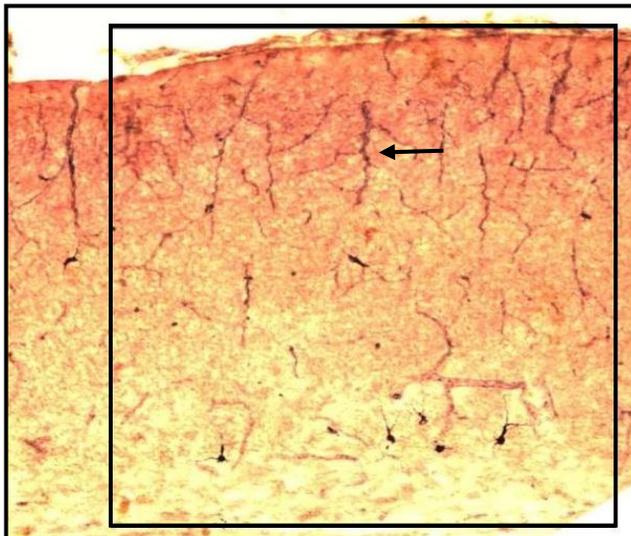
**Tabla IV.10.** Tabla de frecuencias relativas de axones verticales en T1 por capas corticales en V1

Por todo ello, se puede afirmar que según los resultados que hemos obtenido, los **axones verticales NADPH-d tienen una gran densidad de población en las capas superficiales de la corteza siendo los elementos más numerosos en ellas** mientras que **desciende su densidad a la mitad aproximadamente en capas medias para casi desaparecer en capas profundas** de la corteza de V1 en T1.

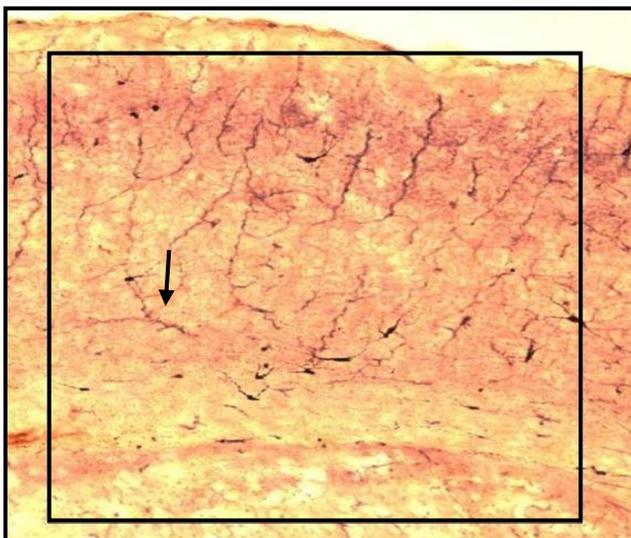
En las imágenes siguientes se puede observar los resultados que hemos encontrado (Fig. IV.9., Fig. IV.10., Fig. IV.11. y Fig. IV.12.):



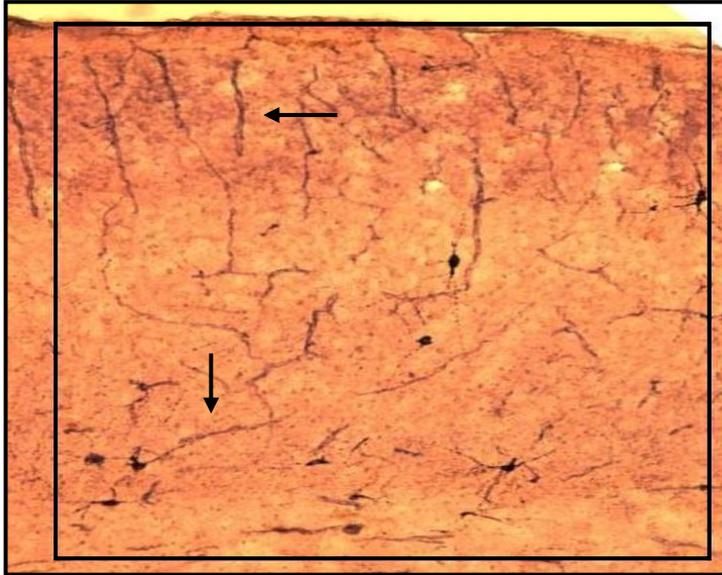
**Fig. IV.9.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian numerosos elementos axonales (flecha) NADHP-d verticales predominando en las capas corticales superficiales de V1



**Fig. IV.10.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian axones NADHP-d verticales (flecha) en las capas más superficiales de V1



**Fig. IV.11.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian axones NADHP-d horizontales (flecha) en las capas medias y profundas de V1



**Fig. IV.12.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T1 marcado con el área de conteo en el que se aprecian axones NADHP-d verticales en capas superficiales (flecha horizontal) y axones horizontales en las capas medias y profundas de V1 (flecha vertical)

#### 4.1.2. Resultados en ratas Wistar de tres meses de vida o T2:

En las ratas de tres meses de vida consideradas adultas, hemos realizado el conteo de neuronas y axones en el área estudiada de V1 con la misma sistemática expuesta en el apartado anterior de manera que, a continuación se detallaran los resultados obtenidos.

Se ha realizado el conteo total de neuronas en términos absolutos en todas las capas obteniendo un total de 286 neuronas de las cuales 161 neuronas fueron horizontales respecto a la superficie de la corteza y 125 neuronas se orientaron verticalmente (ver Tabla IV.11.).

Neuronas T2																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL				
Horizontales	7	13	23	15	8	5	0	0	0	0	0	161				
Verticales	10	15	33	8	5	0	0	0	0	0	0	125				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TOTAL
Rec.TOTAL	0	9	19	21	12	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	286

**Tabla IV.11.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en global en T2

Además, se calcularon las medias con sus desviaciones estándar como en el apartado anterior de manera que con los siguientes resultados la media de neuronas totales en este estadio fue de  $4.03 \pm 1.44$ . Si las diferenciamos según su orientación la media de densidad de neuronas horizontales fue de  $2.27 \pm 1.35$  mientras que en las verticales fue de  $1.76 \pm 1.06$  (ver Tabla IV.12.).

Neuronas Horizontales (%)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	9.9	18.3	32.4	21.1	11.3	7	0	0	0	0	$2.27 \pm 1.35$

Neuronas Verticales (%)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
T2	14.1	21.1	46.5	11.3	7	0	0	0	0	0	0	$1.76 \pm 1.06$

TOTAL Neuronas (%)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	$\bar{x} \pm s$
T2	0	12.7	26.8	29.6	16.9	7	4.2	2.8	0	0	0	0	0	0	0	$4.03 \pm 1.44$

**Tabla IV.12.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas en global en T2

Así pues, según estos datos se puede afirmar que se produce una **disminución del número global de neuronas NADPH-d en ratas adultas respecto a las de una semana de vida siendo la media global de neuronas aproximadamente la mitad de las observadas en el periodo postnatal.**

Por otro lado, en ratas adultas las **neuronas horizontales tienen una mayor densidad poblacional que las verticales** (en los siguientes apartados de Resultados se compararan los diferentes estadios entre sí además de calcular la significación estadística de los cambios evolutivos observados).

Posteriormente, se estudiaron las neuronas verticales y las horizontales por separado analizando las diferencias entre las capas de la corteza.

En el caso de las **neuronas horizontales NADPH-d en T2** se encontró en términos absolutos en las capas 1 y 2 de la corteza un total de 22 neuronas , en las capas 3 y 4 de la corteza se encontraron 42 neuronas horizontales mientras que en las capas 5 y 6 se encontraron 97 neuronas (ver Tabla IV.13.).

<b>Neuronas Horizontales T2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
Capa 1/2	54	12	5	0	0	0	0	0	0	0	22
Capa 3/4	44	16	7	4	0	0	0	0	0	0	42
Capa 5/6	19	21	19	10	2	0	0	0	0	0	97

**Tabla IV.13.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas horizontales en T2 por capas corticales en V1*

Se calcularon posteriormente las medias con sus desviaciones estándar teniendo los siguientes resultados (ver Tabla IV.14.):

- En las capas 1 y 2 la media de densidad de neuronas horizontales fue de  $0.31 \pm 0.6$
- En las capas 3 y 4 la media fue de  $0.59 \pm 0.89$
- En las capas 5 y 6 fue de  $1.37 \pm 1.11$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 1/2											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	76.1	16.9	7	0	0	0	0	0	0	0	$0.31 \pm 0.6$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 3/4											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	62	22.5	9.9	5.6	0	0	0	0	0	0	$0.59 \pm 0.89$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 5/6											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	26.8	29.6	26.8	14.1	2.8	0	0	0	0	0	$1.37 \pm 1.11$

**Tabla IV.14.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas horizontales en T2 por capas corticales en V1

Así pues, según nuestros datos podemos afirmar que las **neuronas horizontales NADPH-d en las ratas adultas tienen una densidad de población mayor en las capas medias y profundas de V1, siendo más abundantes en éstas últimas.**

Se estudiaron por otro lado las **neuronas verticales NADPH-d en T2** en términos absolutos, de manera que, en las capas 1 y 2 se encontraron un total de 40 neuronas, en las capas 3 y 4 se hallaron un total de 62 neuronas

mientras que en las capas 5 y 6 el conteaje total fue de 23 neuronas (ver Tabla IV.15.).

<b>Neuronas Verticales T2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<b>TOTAL</b>
Capa 1/2	40	23	7	1	0	0	0	0	0	0	<b>40</b>
Capa 3/4	28	26	15	2	0	0	0	0	0	0	<b>62</b>
Capa 5/6	54	12	4	1	0	0	0	0	0	0	<b>23</b>

**Tabla IV.15.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas verticales en T2 por capas corticales en V1*

Al calcular las medias con sus desviaciones estándar se encontró(ver Tabla IV.16.):

- En las capas 1 y 2 la media con su desviación fue de  $0.56 \pm 0.73$
- En las capas medias 3 y 4 se obtuvo una media de  $0.87 \pm 0.84$
- En las capas 5 y 6 fue de  $0.32 \pm 0.65$

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 1/2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	56.3	32.4	9.9	1.4	0	0	0	0	0	0	<b>0.56 ± 0.73</b>

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 3/4</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	39.4	36.6	21.1	2.8	0	0	0	0	0	0	<b>0.87 ± 0.84</b>

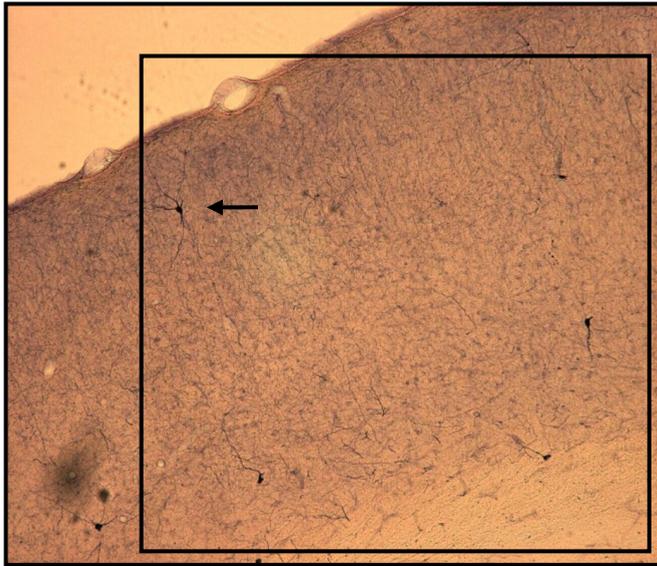
  

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 5/6</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T2	76.1	16.9	5.6	1.4	0	0	0	0	0	0	<b>0.32 ± 0.65</b>

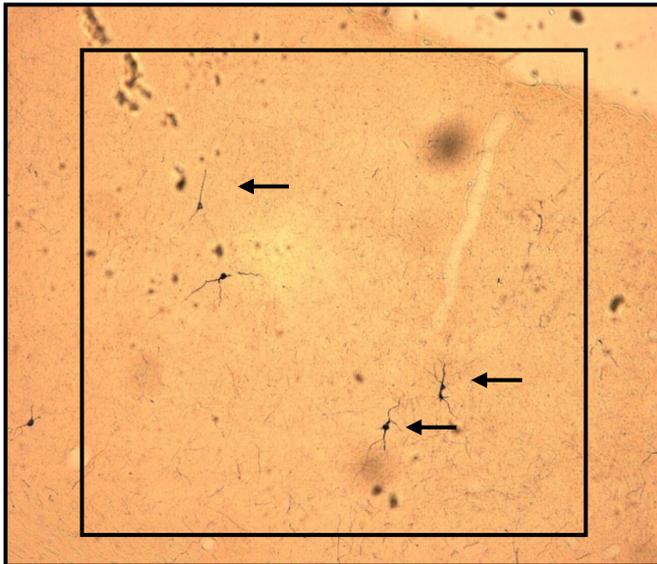
**Tabla IV.16.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas verticales en T2 por capas corticales en V1

Por todo ello, podemos afirmar que las **neuronas verticales en ratas adultas NADPH-d son más numerosas en las capas medias y capas superficiales**. En donde hemos encontrado una menor densidad de neuronas verticales ha sido en las capas 5 y 6 de la corteza visual primaria.

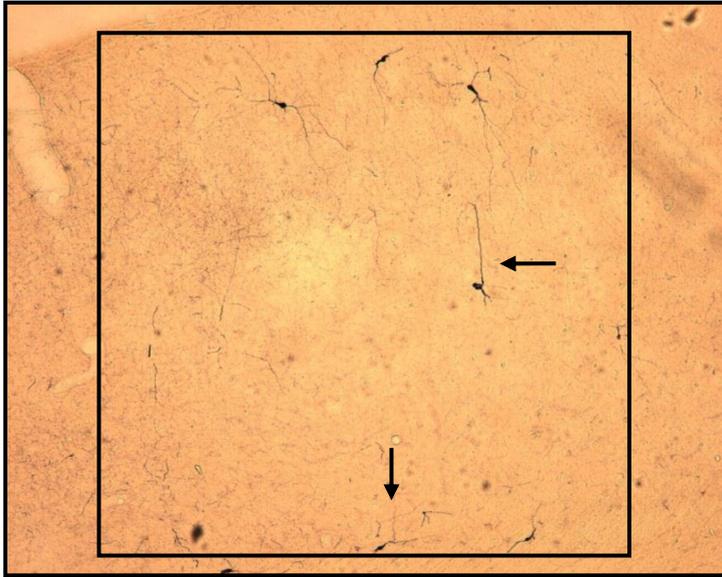
Estos resultados observados en ratas adultas los podemos observar en las imágenes siguientes (Fig. IV.13, Fig. IV.14. y Fig. IV.15.).



**Fig. IV.13.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T2 marcado con el área de conteo en el que se aprecian neuronas NADHP-d. Se observa una menor densidad poblacional global de neuronas NADPH-d (flecha) respecto a T1.



**Fig. IV.14.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T2 marcado con el área de conteo en el que se aprecian neuronas NADHP-d verticales (flechas) en capas medias y superficiales de V1



**Fig. IV.15.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T2 marcado con el área de conteo en el que se aprecian neuronas NADPH-d verticales en capas medias de V1 (flecha horizontal) y se observan neuronas NADPH-d horizontales en capas profundas de V1 (flecha vertical)

Por último, en las ratas adultas, se realizó el estudio de los axones globalmente y por capas.

De esta manera obtuvimos un total de 226 axones todos ellos verticales, es decir, **no se encontraron axones horizontales NADPH-d en T2**. Por tanto, la media total se calculó de los **axones verticales NADPH-d en T2 encontrados pudiendo decir que la media de la densidad poblacional fue  $3.18 \pm 1.58$  axones verticales (y totales) en el área estudiada** (ver Tabla IV.17. y Tabla IV.18.).

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Axones T2																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	TOTAL		
Horizontales	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Verticales	5	2	18	19	9	13	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226	
TOTAL	5	2	18	19	9	13	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226	

**Tabla IV.17.** Tabla de frecuencias absolutas de axones en global en T2

Axones Horizontales (%)																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	$\bar{x} \pm s$													
T2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0													

Axones Verticales (%)																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	$\bar{x} \pm s$		
T2	7	2.8	25.4	26.8	12.7	18.3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.18 ± 1.58	

TOTAL Axones (%)																										
	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	26	29	$\bar{x} \pm s$
T2	7	2.8	25.4	26.8	12.7	18.3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.18 ± 1.58

**Tabla IV.18.** Tabla de frecuencias relativas de axones en global en T2

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

En **axones verticales NADPH-d en T2 (y totales)** la distribución fue la siguiente:

En las capas 1 y 2 el total de axones verticales encontrados fue de 156, en las capas 3 y 4 fue de 69 axones mientras que solo se encontró un axón vertical en las capas 5 y 6 (ver Tabla IV.19.).

**Axones Verticales T2**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
Capa 1/2	7	4	32	24	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	156
Capa 3/4	33	11	23	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	69
Capa 5/6	70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

**Tabla IV.19.** *Tabla de frecuencias absolutas de axones verticales (y totales ya que no se observaron horizontales) en T2 por capas corticales en V1*

En cuanto a las medias calculadas de los axones verticales (y totales) en T2 (ver Tabla IV.20.):

- En las capas 1 y 2 fue de  $2.2 \pm 0.99$
- En las capas medias 3 y 4 la media con su desviación estándar fue de  $0.97 \pm 1.01$
- En las capas 5 y 6 la media fue de  $0.01 \pm 0.12$

Axones Verticales (%) - Capa 1/2																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T2	9.9	5.6	45.1	33.8	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22 ± 0.99

Axones Verticales (%) - Capa 3/4																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T2	46.5	15.5	32.4	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.97 ± 1.01

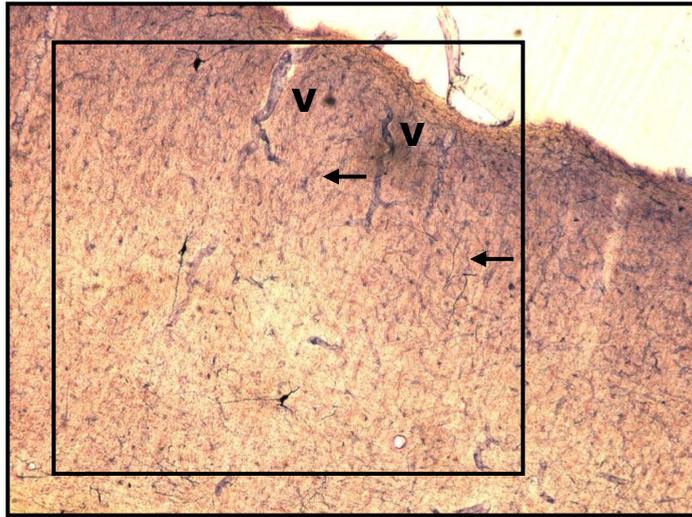
  

Axones Verticales (%) - Capa 5/6																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T2	98.6	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01 ± 0.12

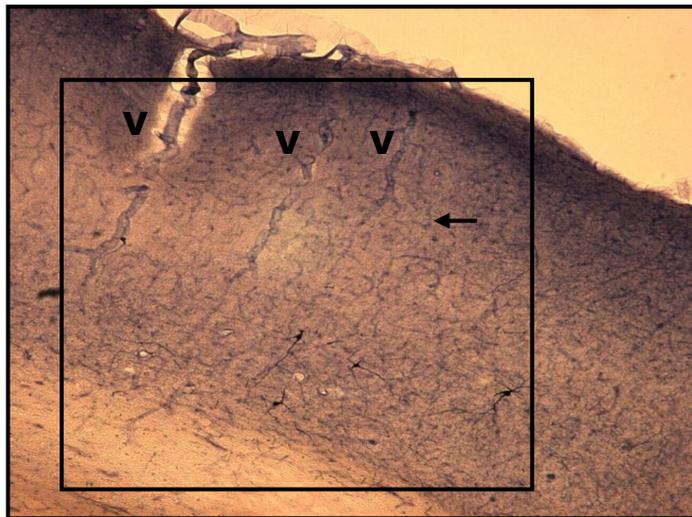
**Tabla IV.20.** Tabla de frecuencias relativas de axones verticales (y totales ya que no se observaron horizontales) en T2 por capas corticales en V1

Según todos estos datos, podemos afirmar que **no se observan axones NADPH-d horizontales en V1 en T2** en ninguna de las capas corticales y que los **axones NADPH-d verticales se distribuyeron en mayor densidad a nivel de capas superficiales para descender en capas medias y prácticamente desaparecer en las capas profundas de la corteza visual.**

A continuación exponemos imágenes de las muestras en las que se observan axones en ratas de tres meses de vida (Fig. IV.16. y fig. IV.17.).



**Fig. IV.16.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T2 marcado con el área de conteo en el que se aprecian axones NADHP-d verticales (flecha) en mayor densidad en capas superficiales de V1. Se observa el endotelio teñido con tinción NADPH-d en dos vasos (V) sanguíneos verticales a la superficie de la corteza



**Fig. IV.17.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T2 en el que se aprecian axones NADHP-d verticales (flecha) en mayor densidad en capas superficiales de V1. Se observa el endotelio teñido de tres vasos sanguíneos (V) verticales a la superficie de la corteza.

### 4.1.3. Resultados en ratas Wistar de un año de vida o T3:

En las ratas de un año de vida hemos realizado el contaje de neuronas y axones en el área estudiada de la misma manera que en los estadios de edad anteriores. En principio se ha realizado el contaje global en términos absolutos de neuronas y axones; posteriormente se han calculado las medias con su desviación estándar y se ha analizado la distribución de ambos elementos por capas en V1.

En términos absolutos, en el caso de las neuronas, hemos encontrado un total de 188 neuronas en T3, de las cuales, 118 son neuronas horizontales y 70 neuronas son verticales (ver Tabla IV.21.).

Neuronas T3																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL				
Horizontales	8	14	16	10	8	2	0	0	0	0	0	118				
Verticales	19	16	16	6	1	0	0	0	0	0	0	70				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TOTAL
Rec.TOTAL	4	14	17	13	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	188

**Tabla IV.21.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en global en T3

Así pues, en el cálculo de las medias con sus desviaciones estándar hemos encontrado una media total de neuronas en T3 de  $3.24 \pm 1.3$ , siendo la media en el caso de las horizontales de  $2.03 \pm 1.36$  y en las verticales la media es de  $1.21 \pm 1.07$  (ver Tabla IV.22.).

Neuronas Horizontales (%)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	13.8	24.1	27.6	17.2	13.8	3.4	0	0	0	0	$2.03 \pm 1.36$

Neuronas Verticales (%)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
T3	32.8	27.6	27.6	10.3	1.7	0	0	0	0	0	0	$1.21 \pm 1.07$

TOTAL Neuronas (%)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	$\bar{x} \pm s$
T3	6.9	24.1	29.3	22.4	13.8	1.7	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	$3.24 \pm 1.13$

**Tabla IV.21.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas en global en T3

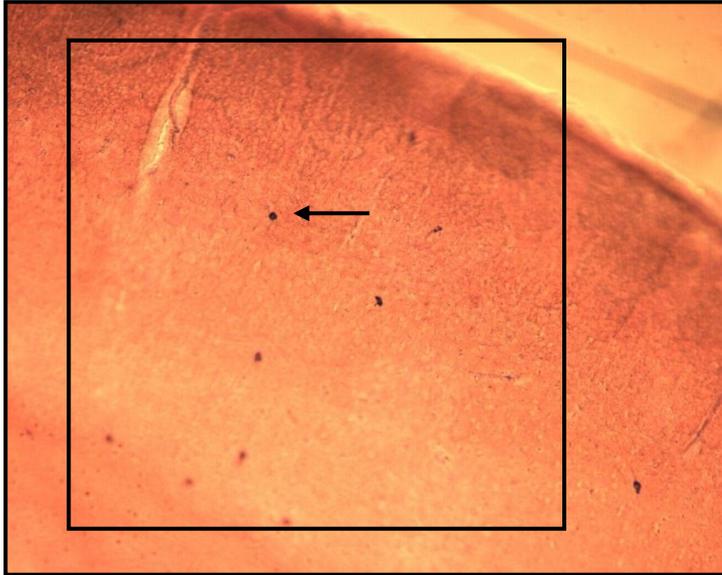
Por todo ello, podemos decir que según nuestros datos observados, **en ratas viejas se encuentra un menor número de neuronas NADPH-d en global que en ratas adultas** (la media global de neuronas en T2 era de  $4.03 \pm 1.44$  ). Aunque esta disminución no es tan llamativa como sucedía de ratas de una semana de vida a adultas (cuya media global de neuronas en T1 era de  $8.24 \pm 2.84$ ).

Además, es importante destacar que **son más numerosas también en T3 las neuronas horizontales NADPH-d que las verticales, en**

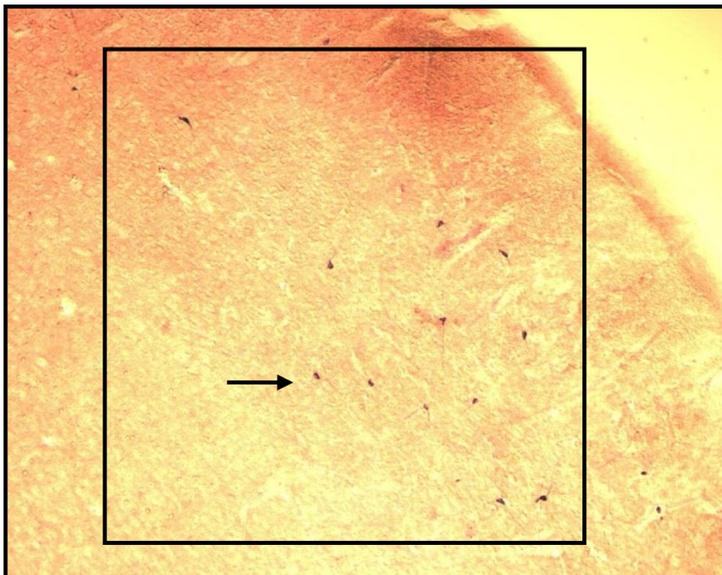
***T3 se observaron prácticamente el doble de neuronas horizontales que verticales.***

En resumen, globalmente, en ratas de una semana de vida hay más neuronas que en ratas adultas y en ratas viejas, siendo en éstas últimas donde menos neuronas hemos encontrado. Hemos observado una ***disminución en la densidad poblacional de neuronas NADPH-d con la edad*** (Fig.IV.18.).

Por otro lado, hemos observado un ***cambio en la orientación de las neuronas NADPH-d***, mientras que en ratas en T1 eran las verticales las más numerosas, hemos encontrado en el caso de T2 y T3 una mayor densidad poblacional de neuronas horizontales (Figura IV.19.). Todos estos cambios evolutivos se estudiarán posteriormente en el último apartado de Resultados.



**Fig. IV.18.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T3 marcado con el área de conteo en el que se aprecia una menor densidad poblacional de neuronas NADPH-d en global (flecha)



**Fig. IV.19.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T3 marcado con el área de conteo en el que se aprecia una mayor densidad poblacional de neuronas horizontales NADPH-d (flecha) en las capas medias y profundas de V1

En el estudio por distribución en las capas de la corteza hemos encontrado en las **neuronas horizontales NADPH-d en T3** globalmente en términos absolutos se han hallado 24 neuronas en las capas 1 y 2, 52 neuronas en las capas 3 y 4 medias y finalmente en las capas 5 y 6 más profundas se han encontrado 42 neuronas horizontales (Tabla IV.22.).

<b>Neuronas Horizontales T3</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
Capa 1/2	42	10	5	0	1	0	0	0	0	0	24
Capa 3/4	24	20	10	4	0	0	0	0	0	0	52
Capa 5/6	26	22	10	0	0	0	0	0	0	0	42

**Tabla IV.22.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en horizontales en T3 por capas corticales en V1*

En cuanto a las medias calculadas de neuronas horizontales en T3 con sus desviaciones estándar los resultados han sido (Tabla IV.23.):

- En las capas 1 y 2 la media con su desviación fue de  $0.41 \pm 0.8$
- En las capas 3 y 4 se ha calculado una media de  $0.9 \pm 0.93$
- En las capas profundas 5 y 6 la media fue de  $0.72 \pm 0.74$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 1/2											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	72.4	17.2	8.6	0	1.7	0	0	0	0	0	$0.41 \pm 0.8$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 3/4											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	41.4	34.5	17.2	6.9	0	0	0	0	0	0	$0.9 \pm 0.93$

Neuronas Horizontales (%) - Capa 5/6											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	44.8	37.9	17.2	0	0	0	0	0	0	0	$0.72 \pm 0.74$

**Tabla IV.23.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas horizontales en T3 por capas corticales en V1

Por todos estos datos observados, podemos decir que según las muestras observadas las **neuronas horizontales NADPH-d son más abundantes en capas medias y profundas de la corteza visual que en capas superficiales. Este comportamiento se repite en las tres edades analizadas.**

En el caso de las **neuronas verticales NADPH-d en T3** también hemos hecho el conteo de distribución por capas. De manera que, hemos encontrado un total de 29 neuronas verticales en las capas 1 y 2 de la corteza, un total de 32 neuronas en las capas medias 3 y 4 siendo finalmente el total en las capas profundas 5 y 6 de tan solo 9 neuronas (ver Tabla IV.24.).

<b>Neuronas Verticales T3</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
Capa 1/2	35	17	6	0	0	0	0	0	0	0	29
Capa 3/4	33	18	7	0	0	0	0	0	0	0	32
Capa 5/6	51	5	2	0	0	0	0	0	0	0	9

**Tabla IV.24.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en verticales en T3 por capas corticales en V1*

En el cálculo de las medias con sus desviaciones estándar hemos encontrado (ver Tabla.IV.25.):

- En las capas 1 y 2 la media fue  $0.5 \pm 0.68$
- En las capas 3 y 4 la media fue  $0.55 \pm 0.71$
- En capas profundas 5 y 6 la media fue de  $0.16 \pm 0.45$

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 1/2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	60.3	29.3	10.3	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.5 ± 0.68</b>

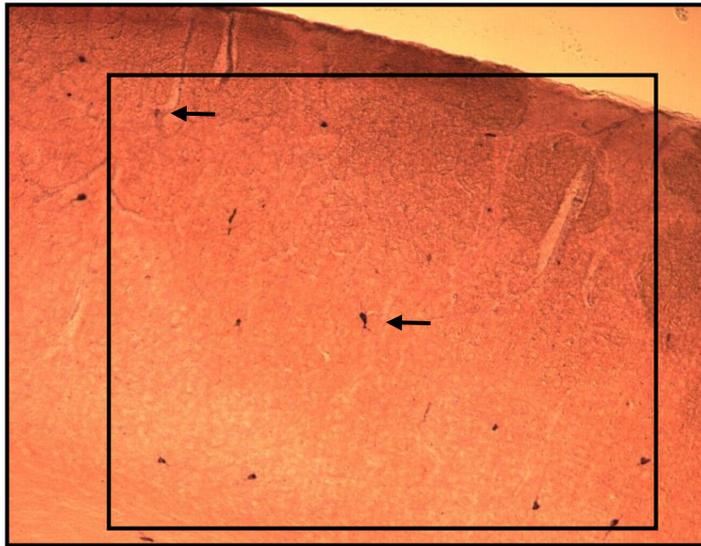
<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 3/4</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	56.9	31	12.1	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.55 ± 0.71</b>

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 5/6</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T3	87.9	8.6	3.4	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.16 ± 0.45</b>

**Tabla IV.25.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas verticales en T3 por capas corticales en V1

En resumen, podemos afirmar según nuestros datos, que las **neuronas verticales NADPH-d en T3 son más abundantes en capas superficiales y medias de V1** (prácticamente no se observan en capas profundas de la corteza visual)(ver Fig. IV. 20.).



**Fig. IV.20.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T3 marcado con el área de conteo en el que se aprecia una mayor densidad poblacional de neuronas verticales en las capas superficiales y medias de V1 (flechas)  
Por otro lado, se realizó en estudio de los elementos axonales.

En el caso de los **axones horizontales NADHP-d en T3** ocurrió lo mismo que en T2. No se encontró ningún axón horizontal en las muestras estudiadas en T3. Por tanto, se podría decir que según lo observado, los **axones horizontales NADPH-d se encuentran solamente en T1, desapareciendo éstos en T2 y en T3.**

Por tanto, el conteo global de axones fue solamente de axones verticales siendo en términos absolutos un total 99 elementos hallados. La media de axones global fue de  $1.71 \pm 1.01$  en el área estudiada (que lógicamente coincide con la de axones verticales al ser éstos los únicos hallados)( ver Tabla IV.26. y Tabla IV.27.).

Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados

Axones T3																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	TOTAL
Horizontales	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verticales	10	9	28	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99

	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	28	29	TOTAL
TOTAL	10	9	28	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99

**Tabla IV.26.** Tabla de frecuencias absolutas de axones verticales en global (y totales ya que no se observaron horizontales) en T3

Axones Horizontales (%)																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	$\bar{x} \pm s$											
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$0 \pm 0$											

Axones Verticales (%)																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T3	17.2	15.5	48.3	17.2	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$17.1 \pm 1.8$	

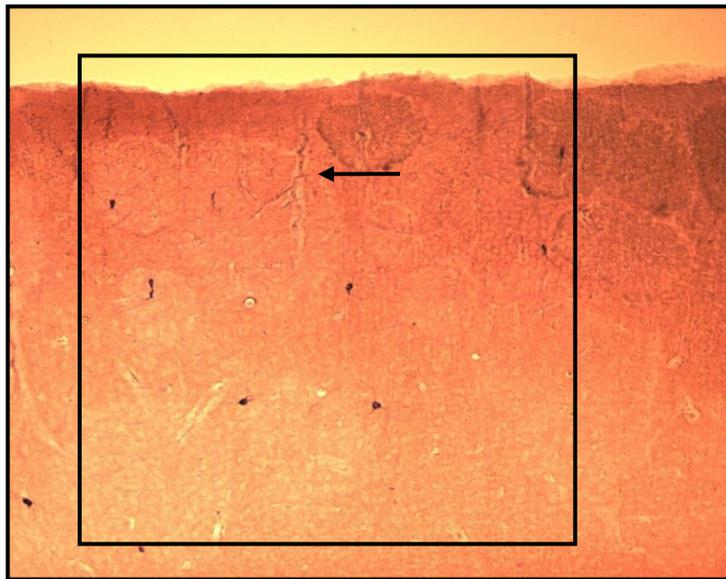
  

TOTAL Axones (%)																											
	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	28	29	$\bar{x} \pm s$	
T3	17.2	15.5	48.3	17.2	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$17.1 \pm 1.8$	

**Tabla IV.27.** Tabla de frecuencias relativas de axones verticales en global (y totales ya que no se observaron horizontales) en T3

Se puede afirmar además, que la **densidad poblacional global de axones NADPH-d disminuye de manera progresiva con la edad** siendo muy numerosos en T1 (la media global era de  $15.06 \pm 4.58$ ) para disminuir notablemente en T2 (la media global fue de  $3.18 \pm 1.51$ ) y ser aún menos numerosos en T3 (media global de  $1.71 \pm 1.01$ ).

Estos resultados se pueden observar en la imagen que exponemos a continuación (Fig. IV. 21.):



**Fig. IV.21.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T3 marcado con el área de conteo en el que se aprecia una menor densidad poblacional de axones verticales NADPH-d (flecha) y no se observan horizontales

Por otro lado, se estudiaron los **axones verticales NADPH-d en T3** según su distribución por capas en la corteza.

Los resultados obtenidos en términos absolutos fueron en las capas 1 y 2 un total de 82 axones verticales mientras que en capas medias 3 y 4 los axones descendieron a un total de 17 y no se encontró ningún axón vertical en nuestras muestras en las capas 5 y 6 de la corteza visual (ver Tabla IV. 28.).

Axones Verticales T3																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL	
Capa 1/2	12	17	22	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
Capa 3/4	46	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
Capa 5/6	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla IV.28.** Tabla de frecuencias absolutas de axones verticales (y totales ya que no se observaron horizontales) en T3 por capas corticales en V1

Las medias con sus desviaciones estándar de los axones verticales en T3 fueron (ver Tabla IV.29.):

- En las capas 1 y 2 fue de  $1.41 \pm 0.96$
- En las capas medias 3 y 4 fue de  $0.29 \pm 0.62$ .
- Al no encontrarse axones en las capas 5 y 6 la media es lógicamente cero

Axones Verticales (%) - Capa 1/2																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T3	20.7	29.3	37.9	12.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.41 ± 0.96

Axones Verticales (%) - Capa 3/4																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T3	79.3	12.1	8.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29 ± 0.62

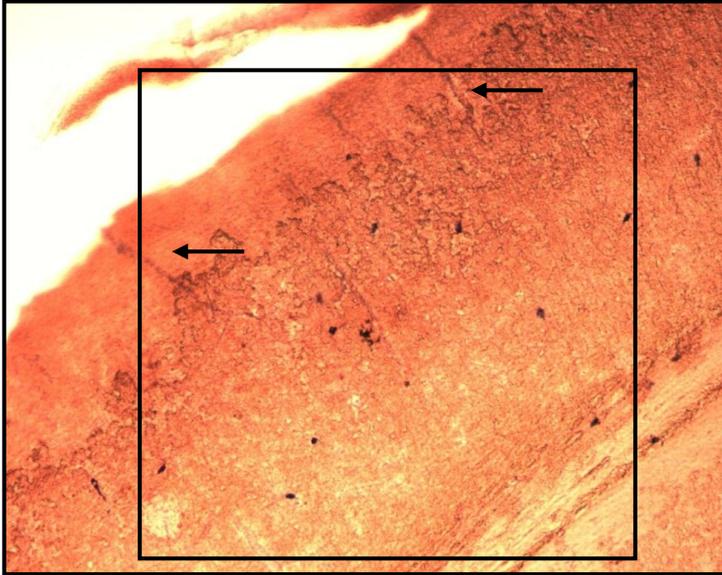
  

Axones Verticales (%) - Capa 5/6																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$	
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0

**Tabla IV.29.** Tabla de frecuencias relativas de axones verticales (y totales ya que no se observaron horizontales) en T3 por capas corticales en V1

Según nuestros datos observados, **no existen axones horizontales en T3 al igual que ocurría en T2 y en el caso de los axones verticales el comportamiento es el mismo en los tres estadios, son más numerosos en capas superficiales para luego descender su densidad en capas medias y no se observan prácticamente en las capas más profundas de la corteza visual.**

Estos resultados se pueden observar en la imagen que exponemos a continuación (Fig. IV.22.):



**Fig. IV.22.** Corte histológico de cerebro de rata Wistar en T3 marcado con el área de conteo en el que se aprecian axones verticales NADPH-d en capas superficiales (flechas) y medias de V1 (no observándose en capas profundas corticales)

## 4.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL RECUENTO DE NEURONAS Y AXONES EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD

### 4.2.1. Recuento general de neuronas en los tres estadios de edad:

En el cuadro siguiente (Tabla IV.30.) se exponen los datos del recuento neuronal total de la corteza cerebral en términos absolutos sobre el área estudiada en los tres estadios de edad.

Neuronas Horizontales											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	3	8	12	9	17	6	4	4	1	2	235
T2	7	13	23	15	8	5	0	0	0	0	161
T3	8	14	16	10	8	2	0	0	0	0	118

Neuronas Verticales												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
T1	1	3	2	14	13	12	10	4	4	2	1	309
T2	10	15	33	8	5	0	0	0	0	0	0	125
T3	19	16	16	6	1	0	0	0	0	0	0	70

TOTAL Neuronas																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TOTAL
T1	0	0	1	2	8	12	6	9	8	6	5	3	2	2	2	544
T2	0	9	19	21	12	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	286
T3	4	14	17	13	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	188

**Tabla IV.30.** Tabla de frecuencias absolutas de neuronas en global y según su orientación en los tres estadios

En la Tabla IV.31. de frecuencias relativas que se expone a continuación hemos estudiado los datos observados en términos porcentuales respecto al número de observaciones en cada estadio temporal calculando las medias con sus desviaciones estándar. En esta tabla se recogen los resultados en los tres estadios de edad para poder compararlos.

<b>Neuronas Horizontales (%)</b>												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$	
T1	4.5	12.1	18.2	13.6	25.8	9.1	6.1	6.1	1.5	3	<b>3.56 ± 2.11</b>	
T2	9.9	18.3	32.4	21.1	11.3	7	0	0	0	0	<b>2.27 ± 1.35</b>	
T3	13.8	24.1	27.6	17.2	13.8	3.4	0	0	0	0	<b>2.03 ± 1.36</b>	

<b>Neuronas Verticales (%)</b>												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
T1	1.5	4.5	3	21.2	19.7	18.2	15.2	6.1	6.1	3	1.5	<b>4.68 ± 2.05</b>
T2	14.1	21.1	46.5	11.3	7	0	0	0	0	0	0	<b>1.76 ± 1.06</b>
T3	32.8	27.6	27.6	10.3	1.7	0	0	0	0	0	0	<b>1.21 ± 1.07</b>

<b>TOTAL Neuronas (%)</b>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	$\bar{x} \pm s$
T1	0	0	1.5	3	12.1	18.2	9.1	13.6	12.1	9.1	7.6	4.5	3	3	3	<b>8.24 ± 2.84</b>
T2	0	12.7	26.8	29.6	16.9	7	4.2	2.8	0	0	0	0	0	0	0	<b>4.03 ± 1.44</b>
T3	6.9	24.1	29.3	22.4	13.8	1.7	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>3.24 ± 1.3</b>

**Tabla IV.31.** *Tabla de frecuencias relativas de neuronas en global y según su orientación en los tres estadios*

En la Tabla IV.31. observamos que en el caso de las **neuronas horizontales NADPH-d** las medias con sus desviaciones estándar fueron:

En T1 fue  $3.56 \pm 2.11$

En T2 fue  $2.27 \pm 1.35$

En T3 fue  $2.03 \pm 1.36$

Es decir, según nuestros datos observados, disminuye la densidad poblacional de neuronas horizontales NADPH-d de T1 a T2 pero luego se mantiene en las neuronas horizontales en global pues las medias en T2 y T3 son similares.

***Por tanto, de ratas jóvenes a adultas sí hay una disminución de neuronas horizontales NADPH-d pero luego se mantiene prácticamente su densidad global poblacional de ratas adultas a ratas viejas.***

El resumen esquemático global de estas **neuronas horizontales NADPH-d** sería:

$$T1 > T2 = T3$$

En el caso de las **neuronas verticales NADPH-d** se observó en los tres estadios las siguientes medias con sus desviaciones estándar:

En T1 fue  $4.68 \pm 2.05$

En T2 fue  $1.76 \pm 1.06$

En T3 fue  $1.21 \pm 1.07$

Por tanto, podemos afirmar según lo observado, que la media de densidad poblacional de neuronas verticales disminuye notablemente de T1 a T2 para luego tener una disminución discreta de T2 a T3.

Así pues, hay una **disminución densidad poblacional de neuronas verticales NADHP-d marcada de ratas jóvenes a adultas, sin embargo, la disminución de esta población neuronal de ratas adultas a viejas es discreta.**

El resumen esquemático global de estas **neuronas verticales NADPH-d** sería:

**T1 >>> T2 > T3**

Consideramos que es importante destacar en el cuadro anterior que **en T1 son las neuronas verticales NADPH-d las que tienen una mayor densidad poblacional mientras que tanto en T2 como en T3 la mayor densidad poblacional corresponde a las neuronas horizontales NADPH-d.**

La disminución poblacional global se debe por tanto en mayor porcentaje por pérdida de neuronas verticales (aunque los cambios evolutivos con su significación estadística se estudiaran en apartados posteriores).

Por otro lado, en cuanto **al recuento global tanto de neuronas verticales como horizontales conjuntamente** se produce una disminución de la densidad neuronal global a medida que avanzamos en los estadios de edades de las ratas estudiadas. De manera que las medias con sus desviaciones estándar en el conteo global de neuronas fueron:

En T1 fue  $8.24 \pm 2.84$

En T2 fue  $4.03 \pm 1.4$

En T3 fue  $3.24 \pm 1.3$

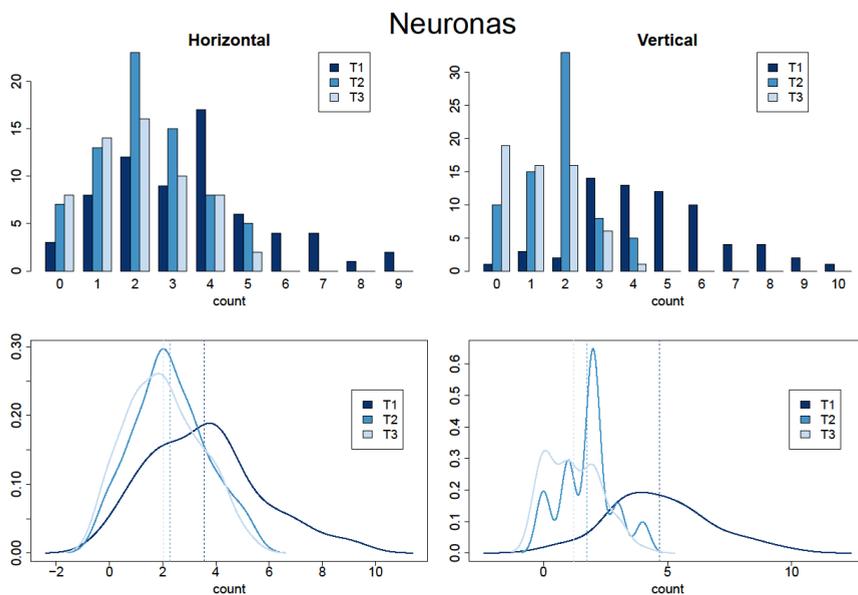
Según estos datos, afirmamos que **la disminución es progresiva en la densidad poblacional global de neuronas NADPH-d de la rata Wistar conforme avanzamos en edad aunque cabe destacar que existe una importante disminución neuronal global de ratas jóvenes a adultas (de adultas a viejas esta disminución poblacional es bastante discreta).**

Un resumen esquemático sería:

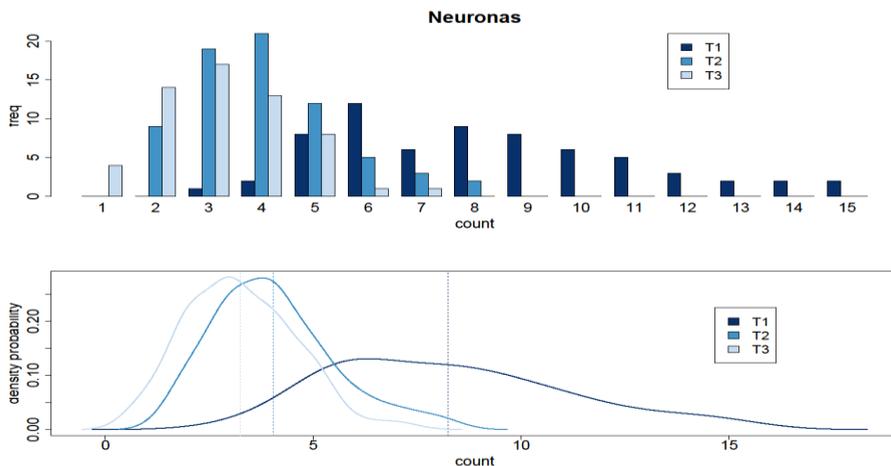
### **NEURONAS EN GLOBAL**

**T1 >>> T2 > T3**

A continuación podemos ver la frecuencia con que aparecen tanto las neuronas horizontales como las verticales en total en los tres estadios de edad mediante los diagramas de barras y líneas de manera separada (ver Gráfica IV.1.). Posteriormente, se representan gráficamente también en conjunto los cambios que se producen en los tres estadios, tanto neuronas NADPH-d horizontales como verticales (ver Gráfica IV.2). Los cambios observados entre estadios se observan gráficamente y concuerdan con lo descrito anteriormente. **El mayor número de neuronas verticales se observa en T1 mientras que en T2 y en T3 aumenta la densidad de neuronas horizontales respecto a las verticales.** Además, se observa gráficamente la **disminución global de densidad neuronal que existe conforme avanzamos en las tres edades** de la rata Wistar estudiadas.



**Gráfica IV.1.** Distribuciones de las neuronas NADPH-d según su orientación en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar



**Gráfica IV.2.** Distribuciones de las neuronas NADPH-d globalmente en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

#### **4.2.2. Recuento de neuronas según la orientación horizontal o vertical por capas de la corteza visual en los tres estadios de edad:**

Neuronas Horizontales:

En la Tabla IV.32. se expone el recuento de neuronas horizontales NADPH-d por capas de la corteza visual en términos absolutos en los tres estadios de edad. En la Tabla IV.33. Podemos observar en términos porcentuales (se observan las medias y su desviaciones estándar de los datos hallados) los cambios por capas entre los tres estadios. Al final de este apartado se exponen estas tablas y una gráfica (Gráfica IV.3.) en las que se observan los resultados obtenidos.

A continuación analizaremos por capas los cambios que se producen en los tres estadios teniendo en cuenta las medias con sus desviaciones estándar:

En las **capas 1 y 2** de la corteza visual las medias de densidad de neuronas horizontales observadas fueron:

En T1 fue  $0.64 \pm 1.03$

En T2 fue de  $0.31 \pm 0.6$

En T3 fue  $0.41 \pm 0.8$

Por tanto, podemos afirmar según lo observado que las **neuronas horizontales NADPH-d disminuyen en las capas 1 y 2 su densidad de población a la mitad de ratas jóvenes a adultas pero prácticamente se mantiene su densidad de población de rata adulta a vieja en estas capas superficiales de la corteza.**

En las **capas 3 y 4** de la corteza visual se produjo un cambio llamativo que se observó en las siguientes medias con sus desviaciones estándar:

En T1 fue  $1.67 \pm 1.88$

En T2 fue  $0.59 \pm 0.89$

En T3 fue  $0.9 \pm 0.93$

Se observa en estos datos un cambio en la evolución de las horizontales en las capas 3 y 4 muy llamativo pues, hay una **disminución de su población de neuronas horizontales NADHP-d de rata joven a adulta a más de la mitad.**

En las **capas 5 y 6** las medias con sus desviaciones estándar en neuronas horizontales fueron:

En T1 fue  $1.26 \pm 1.35$

En T2 fue  $1.37 \pm 1.11$

En T3 fue  $0.72 \pm 0.74$

Así pues, podemos afirmar según lo observado que las **neuronas NADPH-d horizontales en las capas 5 y 6 de la corteza visual mantienen su población de rata joven a adulta para posteriormente descender aproximadamente a la mitad densidad de población en ratas viejas.**

Un resumen esquemático de lo comentado previamente sería:

**NEURONAS HORIZONTALES NADPH-d**

**CAPAS 1 Y 2:  $T_1 \gg T_2 = T_3$**

**CAPAS 3 Y 4:  $T_1 \gg T_2$  y  $T_3 > T_2$**

**CAPAS 5 Y 6:  $T_1 = T_2$  y  $T_2 \gg T_3$**

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

A continuación se exponen las tablas en donde se observan los datos analizados en las neuronas horizontales NADPH por capas corticales en los tres estadios:

Neuronas Horizontales - Capa 1/2											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	42	12	8	3	0	1	0	0	0	0	42
T2	54	12	5	0	0	0	0	0	0	0	22
T3	42	10	5	0	1	0	0	0	0	0	24

Neuronas Horizontales - Capa 3/4											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	24	11	14	8	5	2	0	0	1	1	110
T2	44	16	7	4	0	0	0	0	0	0	42
T3	24	20	10	4	0	0	0	0	0	0	52

Neuronas Horizontales - Capa 5/6											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	25	16	13	10	1	0	0	1	0	0	83
T2	19	21	19	10	2	0	0	0	0	0	97
T3	26	22	10	0	0	0	0	0	0	0	42

**Tabla IV.32.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas NADPH-d horizontales por capas corticales en V1 en los tres estadios de edad*

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Neuronas Horizontales (%) - Capa 1/2											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm \hat{s}$
T1	63.6	18.2	12.1	4.5	0	1.5	0	0	0	0	<b>0.64 ± 1.03</b>
T2	76.1	16.9	7	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.31 ± 0.6</b>
T3	72.4	17.2	8.6	0	1.7	0	0	0	0	0	<b>0.41 ± 0.8</b>

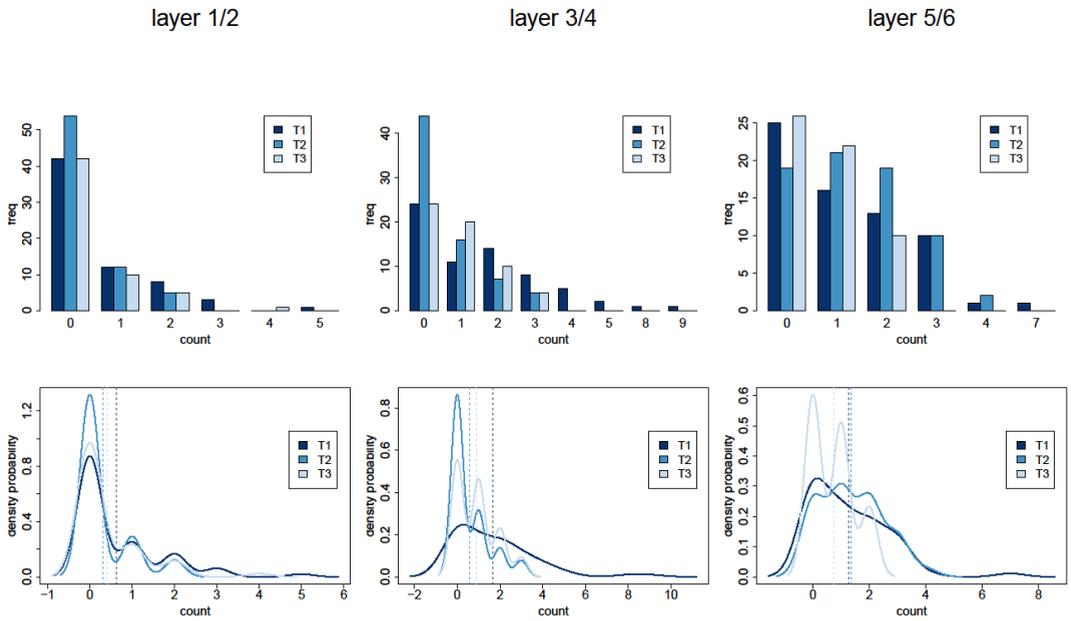
Neuronas Horizontales (%) - Capa 3/4											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm \hat{s}$
T1	36.4	16.7	21.2	12.1	7.6	3	0	0	1.5	1.5	<b>1.67 ± 1.88</b>
T2	62	22.5	9.9	5.6	0	0	0	0	0	0	<b>0.59 ± 0.89</b>
T3	41.4	34.5	17.2	6.9	0	0	0	0	0	0	<b>0.9 ± 0.93</b>

Neuronas Horizontales (%) - Capa 5/6											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm \hat{s}$
T1	37.9	24.2	19.7	15.2	1.5	0	0	1.5	0	0	<b>1.26 ± 1.35</b>
T2	26.8	29.6	26.8	14.1	2.8	0	0	0	0	0	<b>1.37 ± 1.11</b>
T3	44.8	37.9	17.2	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.72 ± 0.74</b>

**Tabla IV.33.** *Tabla de frecuencias relativas de neuronas NADPH-d horizontales por capas corticales en V1 en los tres estadios de edad*

neuronas horizontales



**Gráfica IV.3.** Distribuciones de las neuronas NADPH-d horizontales por capas en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

## Neuronas Verticales

En la Tabla IV.34. se expone el recuento de neuronas verticales NADPH-d por capas de la corteza visual primaria en términos absolutos en los tres estadios de edad y en la Tabla IV.35. Se observan las medias con sus desviaciones estándar en también en los tres estadios. Al final de este apartado se exponen estas tablas y una gráfica (Gráfica IV.4.) en las que se observan los resultados obtenidos.

A continuación analizaremos por capas los cambios en las neuronas NADPH-d verticales que se producen en los tres estadios teniendo en cuenta las medias con sus desviaciones:

En las **capas 1 y 2** de la corteza las medias de densidad de neuronas verticales observadas fueron:

En T1 fue  $2.12 \pm 1.7$

En T2 fue  $0.56 \pm 0.73$

En T3 fue  $0.5 \pm 0.68$

Por tanto, podemos afirmar según lo observado que las **neuronas verticales NADPH-d disminuyen en las capas 1 y 2 su densidad de población muy marcadamente de ratas jóvenes a adultas** (en las adultas son aproximadamente menos de la cuarta parte la población que se

observaba en jóvenes) ***pero se mantiene su densidad de población de rata adulta a vieja en estas capas superficiales de la corteza.***

En las **capas 3 y 4** las medias de densidad de neuronas verticales observadas fueron:

En T1 fue  $1.88 \pm 1.36$

En T2 fue  $0.87 \pm 0.84$

En T3 fue  $0.55 \pm 0.71$

Así pues, según los datos observados, la ***disminución es progresiva en la densidad poblacional de neuronas NADPH-d verticales conforme avanzamos en edad en las capas medias de V1.*** Cabe destacar que se observa a una ***importante disminución de neuronas verticales de ratas jóvenes a adultas*** pues, aproximadamente se reducen a la mitad de la población (de adultas a viejas esta disminución poblacional es bastante discreta).

En las **capas 5 y 6** las medias de densidad de neuronas verticales observadas fueron:

En T1 fue  $0.68 \pm 0.91$

En T2 fue  $0.32 \pm 0.65$

En T3 fue  $0.16 \pm 0.45$

Por tanto, según nuestros datos observados la **disminución es progresiva en la densidad poblacional de neuronas NADPH-d verticales conforme avanzamos en los tres estadios de edad en las capas profundas de la corteza** (se observa que a cada estadio de edad las neuronas verticales disminuyen aproximadamente a la mitad en estas capas con densidades de población muy bajas). Es decir, este tipo de neuronas apenas las observamos en las capas profundas de la corteza visual.

Un resumen esquemático de lo comentado previamente sería:

### **NEURONAS VERTICALES NADPH-d**

**CAPAS 1 Y 2: T1 >>>> T2 = T3**

**CAPAS 3 Y 4: T1 >> T2 > T3**

**CAPAS 5 Y 6: T1 > T2 > T3**

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

A continuación se exponen las tablas en donde se observan los datos analizados en las neuronas verticales NADPH por capas corticales en los tres estadios:

---

**Neuronas Verticales - Capa 1/2**

---

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	11	15	18	10	6	3	2	0	1	0	<b>140</b>
T2	40	23	7	1	0	0	0	0	0	0	<b>40</b>
T3	35	17	6	0	0	0	0	0	0	0	<b>29</b>

---

---

**Neuronas Verticales - Capa 3/4**

---

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	10	19	19	8	7	3	0	0	0	0	<b>124</b>
T2	28	26	15	2	0	0	0	0	0	0	<b>62</b>
T3	33	18	7	0	0	0	0	0	0	0	<b>32</b>

---

---

**Neuronas Verticales - Capa 5/6**

---

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL
T1	36	19	8	2	1	0	0	0	0	0	<b>45</b>
T2	54	12	4	1	0	0	0	0	0	0	<b>23</b>
T3	51	5	2	0	0	0	0	0	0	0	<b>9</b>

---

**Tabla IV.34.** *Tabla de frecuencias absolutas de neuronas NADPH-d verticales por capas corticales en V1 en los tres estadios de edad*

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 1/2</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	16.7	22.7	27.3	15.2	9.1	4.5	3	0	1.5	0	<b>2.12 ± 1.7</b>
T2	56.3	32.4	9.9	1.4	0	0	0	0	0	0	<b>0.56 ± 0.73</b>
T3	60.3	29.3	10.3	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.5 ± 0.68</b>

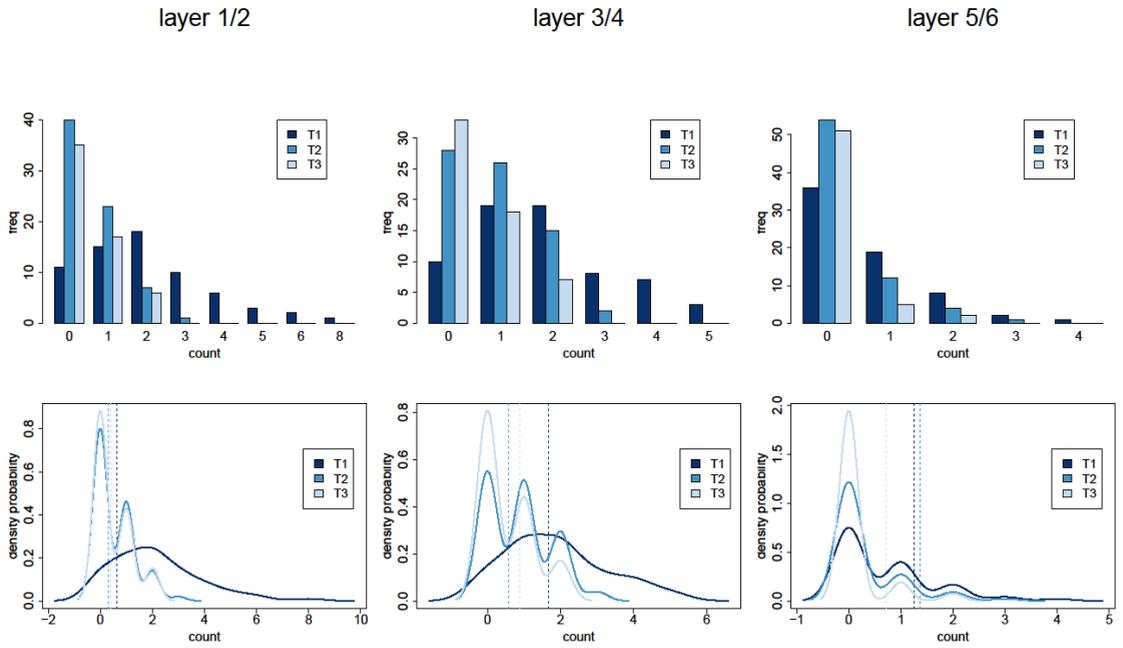
<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 3/4</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	15.2	28.8	28.8	12.1	10.6	4.5	0	0	0	0	<b>1.88 ± 1.36</b>
T2	39.4	36.6	21.1	2.8	0	0	0	0	0	0	<b>0.87 ± 0.84</b>
T3	56.9	31	12.1	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.55 ± 0.71</b>

<b>Neuronas Verticales (%) - Capa 5/6</b>											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s$
T1	54.5	28.8	12.1	3	1.5	0	0	0	0	0	<b>0.68 ± 0.91</b>
T2	76.1	16.9	5.6	1.4	0	0	0	0	0	0	<b>0.32 ± 0.65</b>
T3	87.9	8.6	3.4	0	0	0	0	0	0	0	<b>0.16 ± 0.45</b>

**Tabla IV.35.** Tabla de frecuencias relativas de neuronas NADPH-d verticales por capas corticales en V1 en los tres estadios de edad

neuronas verticales



**Gráfica IV.4.** Distribuciones de las neuronas NADPH-d verticales por capas en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

### 4.2.3. Recuento general de axones en los tres estadios de edad:

En el cuadro siguiente (Tabla IV.36.) se exponen los datos del recuento axonal global de la corteza cerebral en términos absolutos sobre el área estudiada en los tres estadios de edad. Los totales corresponden al número total de axones observados y se han clasificado según su orientación horizontal o vertical respecto a la superficie de la corteza cerebral al igual que se ha hecho en el caso de las neuronas.

Axones Horizontales												
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	TOTAL
T1	16	4	8	14	11	5	2	2	1	2	1	204
T2	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Axones Verticales																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	TOTAL
T1	0	0	0	0	0	2	2	1	1	6	13	11	6	5	6	2	3	4	1	1	1	1	790
T2	5	2	18	19	9	13	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226
T3	10	9	28	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99

TOTAL Axones																										
	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	28	29	TOTAL
T1	0	0	0	0	0	1	0	3	6	4	5	7	9	5	7	5	1	2	2	2	2	2	1	1	1	994
T2	5	2	18	19	9	13	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226
T3	10	9	28	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99

**Tabla IV.36.** Tabla de frecuencias absolutas de axones en global y según su orientación en los tres estadios

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

A continuación exponemos la Tabla IV.37. en la que se observan las medias con sus desviaciones estándar y la analizaremos a continuación:

Axones Horizontales (%)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	
T1	24.2	6.1	12.1	21.2	16.7	7.6	3	3	1.5	3	1.5	<b>3.09 ± 2.93</b>
T2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0 ± 0</b>
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0 ± 0</b>

Axones Verticales (%)																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	
T1	0	0	0	0	0	3	3	1.5	1.5	9.1	19.7	16.7	9.1	7.6	9.1	3	4.5	6.1	1.5	1.5	1.5	1.5	<b>11.97 ± 3.52</b>
T2	7	2.8	25.4	26.8	12.7	18.3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>3.18 ± 1.58</b>
T3	17.2	15.5	48.3	17.2	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1.71 ± 1.01</b>

TOTAL Axones (%)																											
	0	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	28	29		
T1	0	0	0	0	0	1.5	0	4.5	9.1	6.1	7.6	10.6	13.6	7.6	10.6	7.6	1.5	3	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5	<b>15.06 ± 4.58</b>	
T2	7	2.8	25.4	26.8	12.7	18.3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>3.18 ± 1.58</b>	
T3	17.2	15.5	48.3	17.2	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1.71 ± 1.01</b>	

**Tabla IV.37.** *Tabla de frecuencias relativas de axones en global y según su orientación en los tres estadios*

En el **recuento total de axones en global (tanto verticales como horizontales)** se observó que eran los elementos más numerosos en T1 con una media y su desviación estándar que fue de  $15.06 \pm 4.58$ , en T2 la media descendió a  $3.18 \pm 1.58$  que es una disminución muy marcada ya que disminuyeron a una quinta parte aproximadamente de lo que eran y posteriormente en T3 se observó una media de  $1.71 \pm 1.01$ .

Podemos afirmar según los datos previos que, globalmente, **los axones son los elementos observados con mayor densidad poblacional en T1** (ya que la media global de neuronas era de  $8.24 \pm 2.84$ ), pero luego su disminución es muy marcada ya que **disminuyeron su densidad poblacional en ratas adultas a una quinta parte aproximadamente de la población inicial. Y posteriormente, en las ratas viejas la población descendió también a la mitad que en adultas.**

Un resumen esquemático global de axones sería:

#### **AXONES EN GLOBAL**

**T1 >>>>> T2 >> T3**

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

En los **axones horizontales** observamos que sólo aparecían en ratas de una semana de vida con una semana de vida en las cuales la media fue de  $3.09 \pm 2.93$  y luego **desaparecen en ratas adultas y ratas viejas.**

En los **axones verticales** las medias observadas por estadios con sus desviaciones estándar fueron:

T1 fue  $11.97 \pm 3.52$

T2 fue  $3.18 \pm 1.58$

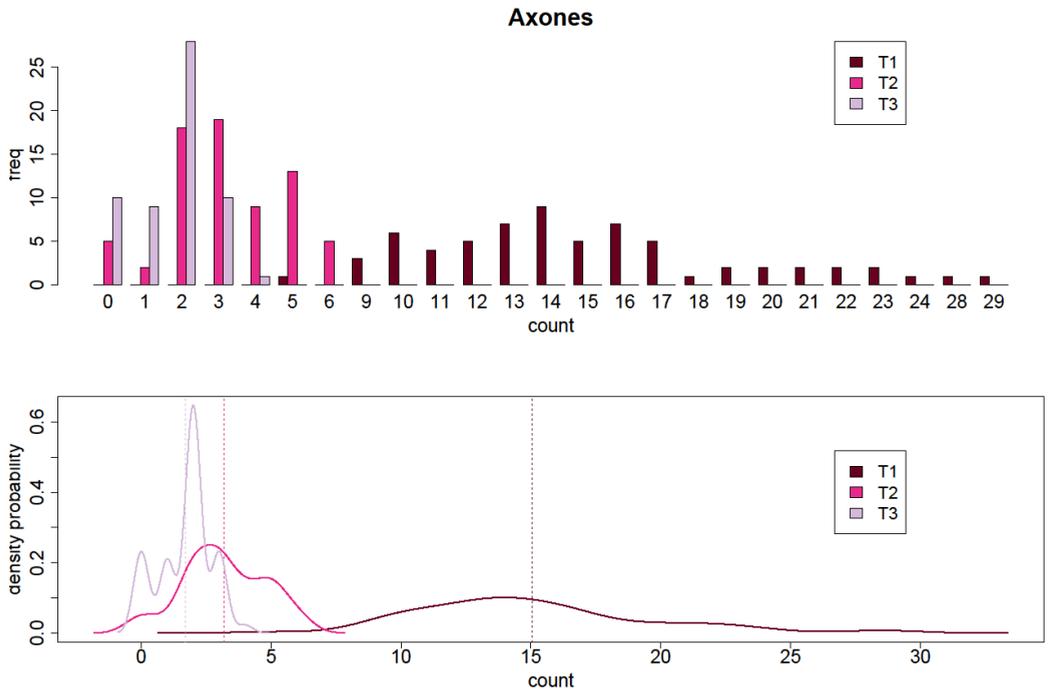
T3 fue  $1.71 \pm 1.01$

Un resumen esquemático sería:

**T1 >>>> T2 >> T3**

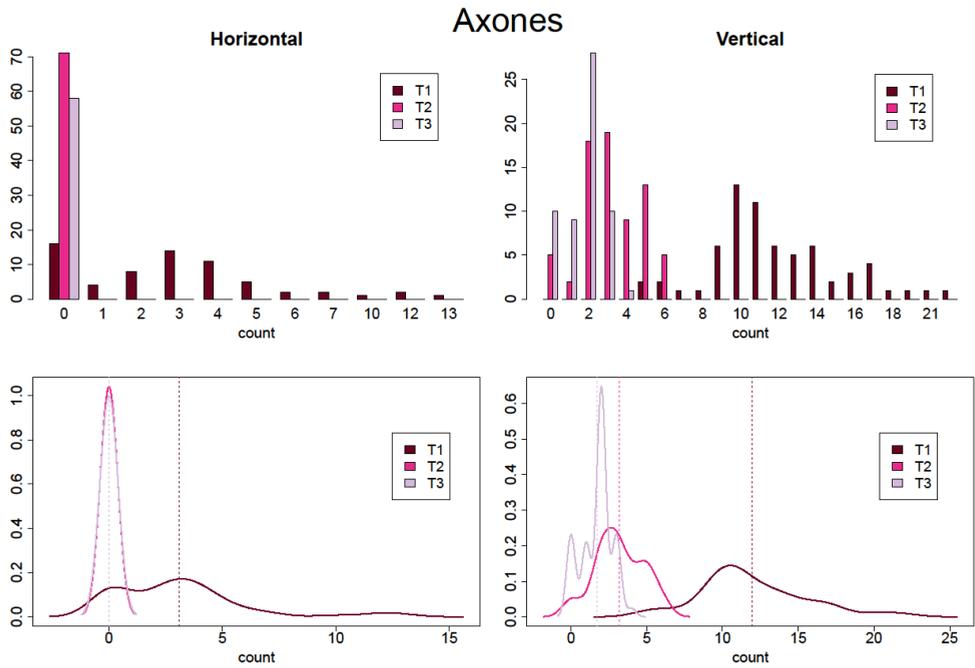
Con lo que según estos datos, podemos afirmar que **los elementos con mayor densidad poblacional observados fueron los axones en T1 siendo la media de densidad poblacional cuatro veces mayor al de los axones verticales observada que la de los horizontales. Posteriormente, en T2 y T3 no se observaron los axones horizontales. Los axones verticales disminuyeron a la tercera parte de su población en ratas adultas para luego disminuir a la mitad de su población de ratas adultas a viejas.**

En las gráficas que se muestran a continuación se pueden ver los resultados observados (Gráfica IV.5. y Gráfica IV.6.):



**Gráfica IV.5.** Distribuciones de los axones NADPH-d globalmente en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados



**Gráfica IV.6.** Distribuciones de los axones NADPH-d según su orientación en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

#### 4.2.4. Recuento de axones según la orientación horizontal o vertical por capas de la corteza visual en los tres estadios de edad:

Según lo observado en nuestro estudio los axones muestran diferentes comportamientos según su orientación en los tres estadios y estas diferencias las analizamos según lo que ocurre en las capas cerebrales.

##### Axones Horizontales

En la Tabla IV.38. se expone el recuento de axones horizontales por capas de la corteza visual en términos absolutos. En la Tabla IV.39. podemos observar en términos porcentuales los cambios que se producen en cada estadio en las diferentes capas de manera que se exponen las medias y sus desviaciones estándar.

Axones Horizontales - Capa 1/2																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Axones Horizontales - Capa 3/4																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	43	1	5	3	6	3	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	107
T2	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Axones Horizontales - Capa 5/6																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	33	5	10	10	5	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97
T2	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla IV.38.** Tabla de frecuencias absolutas de axones horizontales por capas corticales en los tres estadios

Axones Horizontales (%) - Capa 1/2																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm \hat{s}$	
T1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
T2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0

Axones Horizontales (%) - Capa 3/4																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm \hat{s}$	
T1	65.2	1.5	7.6	4.5	9.1	4.5	1.5	1.5	0	0	1.5	0	1.5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.62 $\pm$ 2.89
T2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0

Axones Horizontales (%) - Capa 5/6																									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm \hat{s}$	
T1	50	7.6	5.2	5.2	7.6	3	0	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.47 $\pm$ 2.02
T2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0

**Tabla IV.39.** Tabla de frecuencias relativas de axones horizontales por capas corticales en los tres estadios

Así pues si analizamos las tablas de frecuencias relativas de **axones horizontales** observamos que:

- En las **capas 1 y 2** de la corteza visual **no se observaron axones horizontales en ninguna de las edades estudiadas** de manera que podríamos afirmar, según nuestros datos, que no se encuentran este tipo de axones en estas capas en la corteza cerebral de la rata Wistar en ningún momento de la vida de la rata. Tampoco encontramos estos axones en ninguna capa en la edad adulta y un año de vida.
- En las **capas 3 y 4**  
T1 fue 1.62  $\pm$  2.89 y no se observaron en T2 ni en T3
- En las **capas 5 y 6**  
T1 fue 1.47  $\pm$  2.02 y no se observaron ni en T2 ni en T3

Por tanto, podemos afirmar como resumen esquemático :

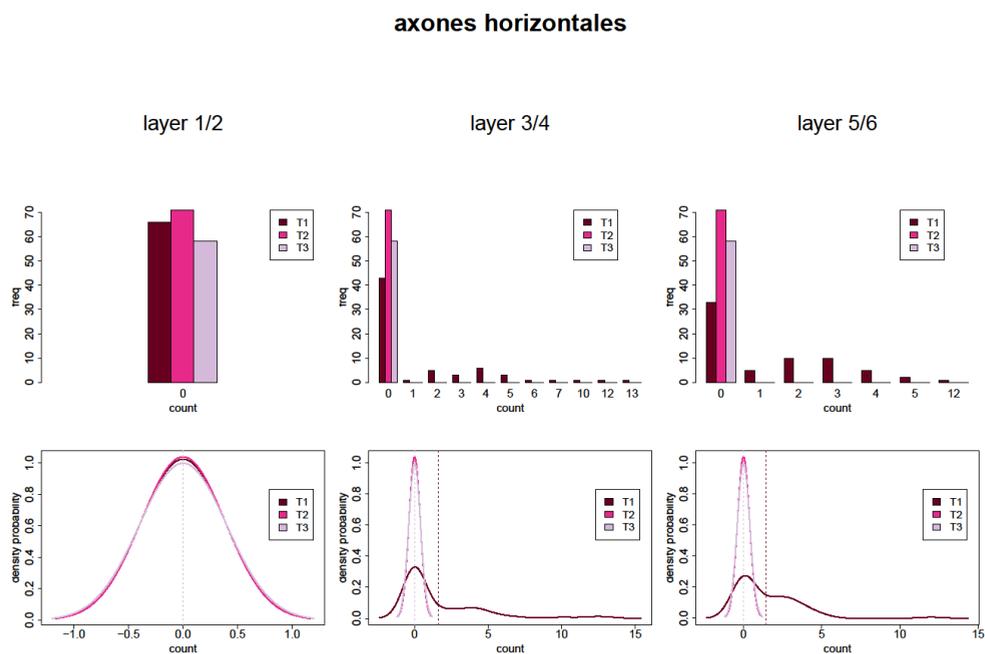
**AXONES HORIZONTALES NADPH-d:**

**CAPAS 1 Y 2:** NO SE OBSERVARON EN NINGUN ESTADIO

**CAPAS 3 Y 4:** SOLO SE OBSERVARON EN T1

**CAPAS 5 Y 6:** SOLO SE OBSERVARON EN T1

En la Gráfica IV.7. se puede observar la distribución de los axones por tiempo en cada capa. En el primer diagrama de barras y líneas vemos que el conteo en todos los estadios de edad en las capas 1 y 2 es cero. En los diagramas de las capas 3 y 4 solamente encontramos axones horizontales en el estadio T1 como también ocurre en las capas 5 y 6 de la corteza visual de la rata Wistar según nuestros datos observados.



**Gráfica IV.7.** *Distribuciones de los axones NADPH-d horizontales por capas en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar*

Axones Verticales

En la Tabla IV.40. se expone el recuento de axones horizontales por capas de la corteza visual en términos absolutos. En la Tabla IV.41. podemos observar en términos porcentuales los cambios que se producen en cada estadio en las diferentes capas de manera que se exponen las medias y sus desviaciones estándar.

Axones Verticales - Capa 1/2																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	0	0	0	0	1	2	12	12	10	11	12	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	562
T2	7	4	32	24	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	156
T3	12	17	22	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82

Axones Verticales - Capa 3/4																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	22	1	5	8	9	8	9	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	195
T2	33	11	23	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	69
T3	46	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17

Axones Verticales - Capa 5/6																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	TOTAL
T1	55	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33
T2	70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
T3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla IV.40.** Tabla de frecuencias absolutas de axones verticales por capas corticales en los tres estadios

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Axones Verticales (%) - Capa 1/2																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	0	0	0	0	1.5	3	18.2	18.2	15.2	16.7	18.2	3	1.5	0	0	0	0	1.5	0	0	1.5	0	1.5	8.52 ± 3.01
T2	9.9	5.6	45.1	33.8	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.2 ± 0.99
T3	20.7	29.3	37.9	12.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.41 ± 0.96

Axones Verticales (%) - Capa 3/4																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	33.3	1.5	7.6	12.1	13.6	12.1	13.6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.95 ± 2.51
T2	46.5	15.5	32.4	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.97 ± 1.01
T3	79.3	12.1	8.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29 ± 0.62

Axones Verticales (%) - Capa 5/6																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\bar{x} \pm s$
T1	83.3	3	3	4.5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5 ± 1.26
T2	98.6	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01 ± 0.12
T3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0

**Tabla IV.41.** *Tabla de frecuencias relativas de axones verticales por capas corticales en los tres estadios*

Los **axones verticales** presentaron las siguientes medias de densidad poblacional con sus desviaciones estándar:

- En las **capas 1 y 2** se observó:

T1 fue  $8.52 \pm 3.01$

T2 fue  $2.2 \pm 0.99$

T3 fue  $1.41 \pm 0.96$

Por tanto, podemos afirmar que según nuestros datos se observa un descenso en la densidad de axones verticales en las capas 1 y 2 de la corteza conforme avanza la edad de la rata de manera progresiva. ***La población de axones verticales disminuyó a la cuarta parte aproximadamente de ratas jóvenes a adultas y después disminuyó discretamente de ratas adultas a viejas.***

- En las **capas 3 y 4** las medias fueron:

T1 fue  $2.95 \pm 2.51$

T2 fue  $0.97 \pm 1.01$

T3 fue  $0.29 \pm 0.62$

Así pues, podemos afirmar que los axones verticales en ratas jóvenes se observan en las capas medias corticales para luego disminuir su población a la tercera parte aproximadamente en ratas adultas y también a la tercera parte de rata adultas a viejas. Es decir, hay una ***disminución progresiva de la población de axones verticales en capas conforme avanzamos en las edades de la rata.*** Es importante destacar que ***prácticamente casi no hay población de axones verticales en capas medias sobre todo en adultas y viejas*** pues las medias observadas son muy pequeñas en comparación con capas superficiales corticales.

- En las **capas 5 y 6** de la corteza apenas observamos axones verticales (en ratas de un año de vida el contaje es cero) pero sí se observaron algunos en ratas de una semana de vida

T1 fue  $0.5 \pm 1.26$

T2 fue  $0.01$   $0.12$

T3 fue  $0$

Es decir, en las **capas profundas de la corteza apenas se observan axones verticales siendo la media muy pequeña incluso en las ratas de una semana de vida.**

Por tanto, podemos afirmar como resumen esquemático :

### **AXONES VERTICALES NADPH-d:**

**CAPAS 1 Y 2: T1 >>>> T2 >> T3**

**CAPAS 3 Y 4: T1 >> T2 > T3**

Se observan muy pocos axones en T1 y la media tiende a cero en ratas adultas y viejas, así pues, prácticamente no se observan axones en estos dos estadios

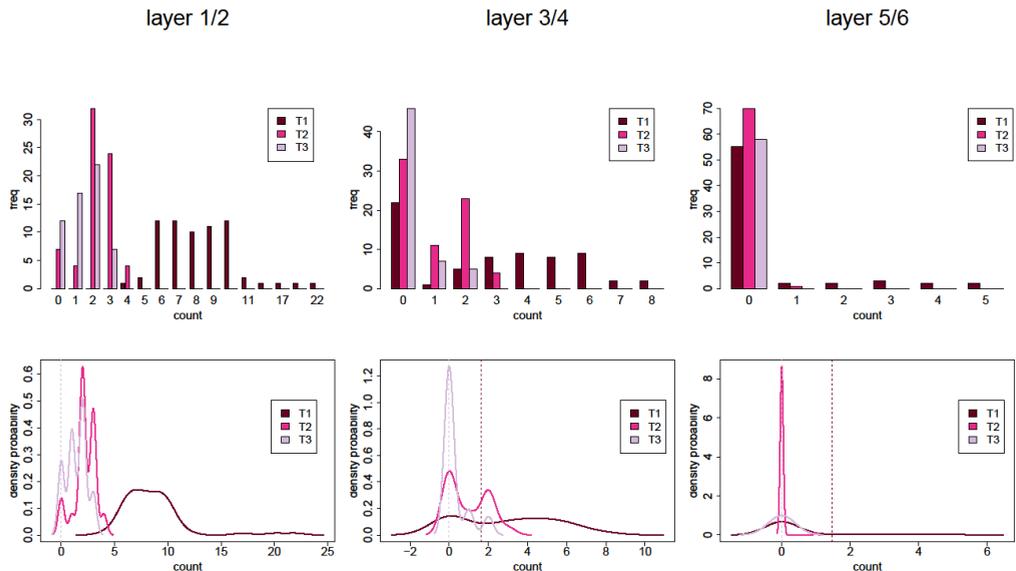
### **CAPAS 5 Y 6:**

La media tiende a cero con lo que prácticamente no se observaron axones en ningún estadio

En la Gráfica IV.8. podemos observar en las figuras de diagramas de barras y diagramas de líneas lo descrito anteriormente numéricamente. De manera que, se observa claramente que el conteo de axones verticales fue cero en las capas 5 y 6 de ratas de un año de vida y prácticamente no se observaron en ratas adultas tampoco.

Por otro lado, como decíamos al principio del apartado la mayor densidad de axones verticales se encuentra en las capas 1 y 2 de todas las edades pero llamativamente son mucho más abundantes en estas capas en las ratas de una semana de vida.

### axones verticales



**Gráfica IV.8.** Distribuciones de los axones NADPH-d verticales por capas en V1 en los tres estadios de edad de la rata Wistar

### **4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS CAMBIOS EN LAS NEURONAS NADPH-D EN LAS CAPAS DE LA CORTEZA VISUAL DE LA RATA WÍSTAR EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD**

A continuación iremos por apartados analizando detenidamente la Tabla IV.42. con los p-valores que nos dan la comparación de los cambios evolutivos entre capas, comparando a pares los estadios. Así pues, podemos afirmar qué confianza estadística tenemos en los cambios que se observan en los resultados obtenidos.

Esta Tabla IV.42. se ha extraído de analizar los datos a pares con el test de Wilcoxon. En dicha tabla se comparan los diferentes estadios entre ellos y las diferentes capas en función de la significancia estadística. De manera que, cuando aparece el símbolo \*\*\* significa que el p-valor de la comparación es menor de 0.001 lo cual nos indica que se trata de un dato “muy significativo” estadísticamente, es decir, existe una gran seguridad en afirmar que el cambio observado entre los estadios tiene una evidencia estadística muy llamativa. Por otro lado, el símbolo \*\* significa que los p-valores son menores de 0.01 que nos indica que el dato es “bastante significativo”. Y por último, cuando aparece el símbolo \* significa que el p-valor es menor de 0.05 con lo cual nos indica que el dato es “suficientemente significativo” estadísticamente.

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Neuronas Horizontales			
	Layer 1/2	Layer 3/4	Layer 5/6
T1 vs T2	0,067189	0.00010765 ***	0.35202
T2 vs T3	0,58513	0.029186 *	0.00091582 ***
T3 vs T1	0,23358	0.034967 *	0.040224 *

Neuronas Verticales			
	Layer 1/2	Layer 3/4	Layer 5/6
T1 vs T2	2.9843e-10 ***	5.742e-06 ***	0.0070954 **
T2 vs T3	0.65096	0.027925 *	0.086019
T3 vs T1	4.5553e-10 ***	4.0395e-09 ***	5.1845e-05 ***

Neuronas			
	Neur. Horizontales	Neur. Verticales	TOTAL Neuronas
T1 vs T2	0.00018537 ***	1.1263e-16 ***	9.6755e-18 ***
T2 vs T3	0.3331	0.0042349 **	0.0030769 **
T3 vs T1	2.5271e-05 ***	2.1192e-17 ***	3.2045e-19 ***

**Tabla IV.42.** *Tabla de significancia estadística (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) como resultado de comparar los datos de neuronas entre estadios temporales.*

### 4.3.1. Neuronas horizontales

Neuronas horizontales en las capas 1 y 2 de la corteza visual:

Así pues, en el cuadro evolutivo (Tabla 13) que analiza la significancia estadística de la muestra vimos que no se observan cambios evolutivos entre los estadios, los p-valores no dan una evidencia significativa para decir que existen cambios entre los tres estadios tanto si comparamos T1 con T2, T2 con T3 o T1 con T3, aparecen p-valores mayores 0.05. Es decir, **en todas las edades ocurre lo mismo, las capas 1 y 2 se observó la misma distribución de densidad neuronal (es decir, observamos pocas neuronas horizontales en las capas superficiales corticales de V1 en todas la edades).**

Neuronas horizontales en las capas 3 y 4 de la corteza visual:

En las capas 3 y 4 de la corteza visual existían cambios muy significativos entre los estadios **T1 y T2** con un p-valor menor de 0.001 si comparamos ambas capas. Es decir, en las capas 3 y 4 en el estadio T1 la media de densidad neuronal con su desviación estándar es  $1.67 \pm 1.88$  mientras que en T2 la media cambia a  $0.59 \pm 0.89$ . Se observó por tanto una **disminución muy marcada de neuronas horizontales desde T1 a T2 con una evidencia estadística muy significativa en las capas medias corticales.**

Sin embargo, si comparamos por otro lado el estadio **T2** con **T3** también se produjo un cambio evolutivo suficientemente significativo con un p-valor menor de 0.05, pero en este caso la media de T3 con su desviación estándar ( $0.9 \pm 0.93$ ) es mayor que la media de T2 ( $0.59 \pm 0.89$ ).

Por otro lado, también existe un cambio significativo estadísticamente con las ratas de un año de vida pero en este caso lo que ocurre es un aumento de la densidad de neuronas horizontales en el estadio T3 (media y desviación estándar:  $0.9 \pm 0.93$ ) respecto a T2 (media y desviación estándar  $0.59 \pm 0.89$ ).

Es decir, ***las ratas de un año de vida aumentan su densidad de neuronas horizontales en las capas 3 y 4 respecto a las adultas de manera suficientemente significativa.***

Neuronas horizontales en las capas 5 y 6 de la corteza visual:

En las capas 5 y 6 de la corteza visual de la rata Wistar hemos observado que no existen cambios estadísticamente significativos entre los estadios de edad T1 y T2, podría decirse por tanto que estas capas se comportan igual tanto en ratas de una semana de vida como en las adultas.

Sin embargo, si comparamos el estadio T2 con T3 las diferencias son muy significativas con un p-valor menor de 0.001. Así pues, podemos decir que existe un cambio muy llamativo entre estos estadios evolutivos. Se observó una ***disminución de densidad neuronal de ratas adultas***

**(media y desviación estándar:  $1.37 \pm 1.11$ ) a ratas de un año de vida (media y desviación estándar:  $0.72 \pm 0.74$ ) de manera muy significativa estadísticamente en estas capas profundas corticales de V1.**

### 4.3.2. Neuronas verticales

Neuronas verticales en las capas 1 y 2 de la corteza visual:

En las capas 1 y 2 de la corteza visual de la rata Wistar existen cambios muy significativos estadísticamente (p-valor menor de 0.001) si comparamos el estadio T1 con T2. En T1 la media con su desviación estándar de densidad neuronal fue  $2.12 \pm 1.7$  mientras que en T2 la media con su desviación estándar de densidad neuronal fue  $0.56 \pm 0.73$ .

De manera que podemos afirmar que se observó una **disminución de neuronas verticales en las capas 1 y 2 muy significativa de ratas de una semana de vida a ratas adultas.**

Por otro lado, si comparamos T2 con T3 se puede afirmar que no existen cambios significativos estadísticamente con un p-valor mayor de 0.05 (en este caso es incluso p-valor =0.65096). El comportamiento es por tanto similar en estas capas entre T2 y T3, **no se hallaron cambios de rata adulta a rata vieja.**

Por último, al comportarse igual T2 que T3 es lógico que si comparamos T3 con T1 también salga estadísticamente muy significativas las diferencias.

En resumen, según nuestros datos podemos afirmar que las neuronas verticales disminuyen mucho **en las capas 1 y 2 de la corteza de ratas de una semana de vida a ratas adultas pero luego se estabiliza y**

***no existen cambios de ratas adultas respecto a ratas de un año de vida.***

### Neuronas verticales en las capas 3 y 4 de la corteza visual

Al igual que hemos observado en las capas 1 y 2, en las capas 3 y 4 existe un cambio con una evidencia muy significativa si comparamos T1 con T2.

En el caso de T1 la media con su desviación estándar de densidad neuronal es  $1.88 \pm 1.36$  y en T2 se produce una disminución muy llamativa de media de densidad neuronal a  $0.87 \pm 0.84$ . Es decir, según los datos observados se puede afirmar que ***existe una disminución muy significativa estadísticamente de neuronas verticales en las capas 3 y 4 de la corteza de ratas de una semana de vida a ratas adultas.***

Por otro lado, si comparamos el estadio T2 con T3 también existe un cambio suficientemente significativo con p-valor menor de 0.05 de manera que se produce una disminución (aunque menos llamativa) de neuronas verticales en las capas 3 y 4 de rata adulta a rata de un año de vida.

La disminución de densidad neuronal de neuronas verticales es progresiva en estas capas en la rata desde una semana a un año de vida.

Neuronas verticales en las capas 5 y 6 de la corteza visual :

En estas capas se produce en los estadios evolutivos un comportamiento similar a lo que ocurre en las capas 1 y 2 de la corteza.

Si comparamos la media de T1 con su desviación estándar,  $0.68 \pm 0.91$ , con la media de densidad en T2,  $0.32 \pm 0.65$ , observamos que prácticamente estas neuronas se reducen a la mitad, con lo que el cambio tiene una evidencia significativa muy llamativa. Es decir, de ***ratas jóvenes a adultas se observó que la población se reducía a la mitad y estos datos fueron muy significativos.***

Por otro lado, si comparamos los cambios evolutivos de T2 a T3 aparece un p-valor = 0.086019, es decir, mayor de 0.05 con lo cual podemos afirmar que estas capas en estos estadios, tienen un comportamiento de distribución de densidad neuronal similar. Es decir, ***no existen cambios significativos en la densidad de neuronas verticales en las capas 5 y 6 si comparamos ratas adultas con ratas de un año de vida.***

Por último, si T2 se comporta como T3, es lógico que si comparamos T1 con T3 el cambio sea también muy significativo con un p-valor menor de 0.001.

### **4.3.3. Estudio Global Neuronal según su orientación**

En las **neuronas horizontales** globalmente (en el recuento total de todas las capas) se produce una disminución muy significativa con un p-valor menor de 0.001 si comparamos el estadio T1 con el T2.

De manera que podemos afirmar que, según nuestros datos, se produce **una disminución muy llamativa de neuronas horizontales de ratas de una semana de vida con las adultas** (con un p-valor de 0.00018537).

Sin embargo, es llamativo también que no existen cambios en el comportamiento de la distribución de los datos entre T2 y T3 (p-valor mayor de 0.05, en este caso es 0.3331). Con lo cual, podemos afirmar que **no existen cambios en global de densidad de neuronas horizontales de ratas adultas a ratas viejas, es decir, su densidad poblacional “se mantiene”**.

Un esquema resumen del comportamiento de las **neuronas horizontales en global** sería: **T1 >> T2 = T3**

Es importante destacar que, **aunque esta densidad de neuronas horizontales disminuya, proporcionalmente, las neuronas horizontales pasan de ser las de menor densidad poblacional en T1 para pasar a ser las de mayor densidad poblacional en T2 y T3 respecto a las verticales.**

Por otro lado, en las **neuronas verticales** globalmente los cambios son incluso mucho más llamativos que en las horizontales con unos p-valores muy pequeños lo cual nos da una gran evidencia significativa en los resultados.

Se produce una disminución muy marcada de densidad neuronal de T1 a T2 con un p-valor de 1.1263e-16 (muy significativo). Por otro lado, también se produce un cambio de densidad neuronal bastante significativo si comparamos globalmente T1 con T2 (p-valor es 0.0042349) en donde también se produce una disminución de densidad neuronal. Por último, al comparar T1 con T3 encontramos diferencias muy significativas.

Por tanto, en **las neuronas verticales se produce una disminución progresiva de densidad neuronal con la edad muy significativa, (pasando de ser las de mayor densidad poblacional en T1 a tener menor densidad poblacional que las horizontales en T2 y T3).**

En resumen, un esquema del comportamiento de las **neuronas verticales en global** sería el siguiente: **T1 >>> T2 >> T3**

Globalmente, según la densidad de todas las neuronas, se produce una disminución progresiva de las medias con sus desviaciones estándar teniendo estos cambios una llamativa evidencia significativa. El comportamiento global de las neuronas conjuntamente verticales y horizontales se parece al comportamiento de las verticales.

**El resumen global de neuronas tanto horizontales como verticales sería: T1 >>> T2 >>T3**

#### 4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS CAMBIOS EN LOS AXONES NADPH-D EN LAS CAPAS DE LA CORTEZA VISUAL DE LA RATA WÍSTAR EN LOS TRES ESTADIOS DE EDAD

En la Tabla IV.43. podemos apreciar los cambios en los p-valores estadísticos que existen tanto en los axones verticales como en los horizontales comparando las tres capas entre los diferentes estadios (T1 con T2, T2 con T3 y finalmente se comparan T1 con T3) de la misma manera que anteriormente se ha descrito con las neuronas. Los datos se han comparado, también a pares, utilizando el **test de Wilcoxon**.

Axones Horizontales			
	Layer 1/2	Layer 3/4	Layer 5/6
T1 vs T2	NA	6.6547e-08 ***	1.6889e-11 ***
T2 vs T3	NA	NA	NA
T3 vs T1	NA	8.4707e-07 ***	7.0349e-10 ***

Axones Verticales			
	Layer 1/2	Layer 3/4	Layer 5/6
T1 vs T2	2.1773e-24 ***	5.1614e-06 ***	0.0014932 **
T2 vs T3	1.0761e-05 ***	4.2448e-05 ***	0.37441
T3 vs T1	5.1086e-22 ***	7.3245e-10 ***	0.0012196 **

Axones			
	Axon. Horizontales	Axon. Verticales	TOTAL Axones
T1 vs T2	7.0809e-19 ***	1.3458e-23 ***	6.9452e-24 ***
T2 vs T3	NaN	2.7238e-08 ***	2.7238e-08 ***
T3 vs T1	2.5516e-16 ***	4.6291e-22 ***	4.9013e-22 ***

**Tabla IV.43.** Tabla de significancia estadística (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) como resultado de comparar los datos de axones entre estadios temporales.

#### 4.4.1. Axones horizontales

- Axones horizontales en las capas 1 y 2 de la corteza visual

En las capas 1 y 2 de la corteza visual de las muestras analizadas **no se han observado axones horizontales** de manera que en la tabla no se hace el test comparativo entre los diferentes estadios.

- Axones horizontales en las capas 3 y 4 de la corteza visual

En las capas 3 y 4 de la corteza visual hay axones horizontales solamente en el estadio T1 (media y desviación estándar:  $1.62 \pm 2.89$ ) pero no se encuentran en las capas T2 y T3.

Por ello, podemos decir que según nuestros datos **solamente se observaron axones horizontales en las capas 3 y 4 de la corteza visual de la rata Wistar de una semana de vida desapareciendo en estas capas en la edad adulta y en un año de vida de la rata.**

- Axones horizontales en las capas 5 y 6 de la corteza visual

En las capas 5 y 6 de la corteza visual ocurre lo mismo que en las capas 3 y 4.

Así pues, según nuestras muestras **solamente se observaron axones horizontales en las capas 5 y 6 de la corteza visual de**

**la rata Wistar cuando ésta tiene una semana de vida** (media y desviación estándar:  $1.47 \pm 2.02$ ), desapareciendo en edades posteriores. Por ello, aparecen en estos dos bloques de capas un p-valor muy significativo estadísticamente si comparamos T1 con T2 o bien T1 con T3, de manera que podemos decir que estos datos tiene una **evidencia estadística muy significativa ( $p\text{-valor} < 0.001$ )**.

#### 4.4.2. Axones verticales

- Axones verticales en las capas 1 y 2 de la corteza visual

En los datos observados se aprecia que existe un p-valor muy significativo si comparamos los estadios T1 con T2. Es decir la media de axones verticales en T1 es con su desviación estándar de  $8.52 \pm 3.01$  y disminuye con una evidencia muy significativa a T2 cuya media y desviación estándar es de  $2.2 \pm 0.99$ .

Por otro lado, si comparamos las ratas adultas de T2 con las de un año de vida en T3 también tiene un p-valor menor de 0.001 con lo que los cambios son también muy llamativos existiendo una disminución de axones verticales, siendo en T3 la media con su desviación estándar de  $1.41 \pm 0.96$ .

Podemos finalmente afirmar que existe una ***disminución con una gran evidencia estadística de axones verticales de manera progresiva (sobre todo de rata de una semana de vida a rata adulta) desde T1 a T3.***

- Axones verticales en las capas 3 y 4 de la corteza visual

Ocurre lo mismo que en las capas 1 y 2, el comportamiento de distribución de la densidad de axones es similar de manera que, podemos

afirmar que existen unos p-valores muy significativos estadísticamente entre los tres estadios.

Se producen diferencias muy llamativas de manera que hay una disminución progresiva en la densidad de axones en las capas 1 y 2 desde T1 a T3 (siendo las medias con sus desviaciones estándar en T1 fue  $2.95 \pm 2.51$ , en T2 fue  $0.97 \pm 1.01$  y finalmente en T3 fue  $0.29 \pm 0.62$ ).

Podemos finalmente afirmar que existe también en estas capas medias, una ***disminución con una gran evidencia estadística de axones verticales de manera progresiva (sobre todo de rata de una semana de vida a rata adulta) desde T1 a T3.***

- Axones verticales en las capas 5 y 6 de la corteza visual

Se produce un cambio muy significativo si comparamos los tres estadios porque existen axones verticales en T1 (media y desviación estándar de  $0.5 \pm 1.26$ ) aunque son muy escasos y después desaparecen en T2 y en T3. Es decir, existen ***muy pocos axones verticales en ratas de una semana de vida y ya desaparecen cuando éstas se hacen adultas en capas profundas corticales de V1.***

#### **4.4.3. Estudio global axonal según su orientación**

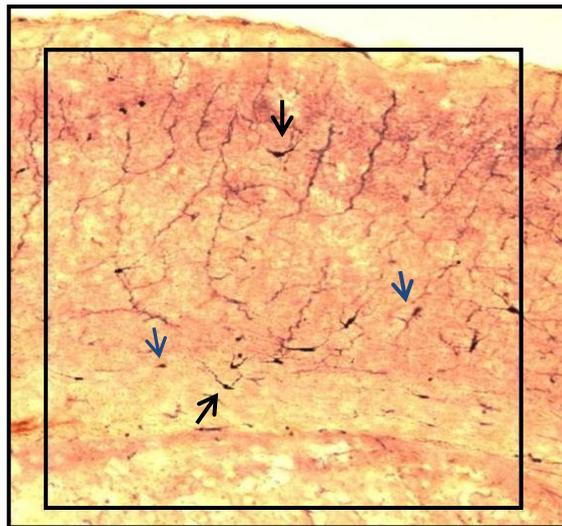
En resumen, podemos afirmar que los axones horizontales desaparecen todos según nuestros datos en T2 y T3, de manera que ***solo se observaron axones horizontales en las ratas de una semana de vida.***

Por otro lado, los axones verticales existen en todos los estadios de la edad de la rata pero se produce una ***disminución de la densidad de los mismos muy significativa y progresiva en las tres edades.*** Por tanto, se observó menos axones verticales en ratas adultas que en ratas de una semana de vida y también menos axones verticales en ratas de un año de vida si las comparamos con las adultas. Estas diferencias entre estadios son muy llamativas con un p-valor menor de 0.001 lo cual nos indica que hay ***una gran evidencia estadística en los datos.***

Finalmente, en términos globales los p-valores apoyan los datos anteriores ya que, los p-valores de comparar conjuntamente *axones verticales y horizontales* entre los estadios nos da una significación estadística muy llamativa. En este caso, pasa también lo mismo que ocurría con las neuronas ya que al casi no observar axones horizontales, son los verticales los que tienen más significancia en nuestros datos.

#### 4.5. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE NEURONAS NADPH-D EN NUESTRO ESTUDIO

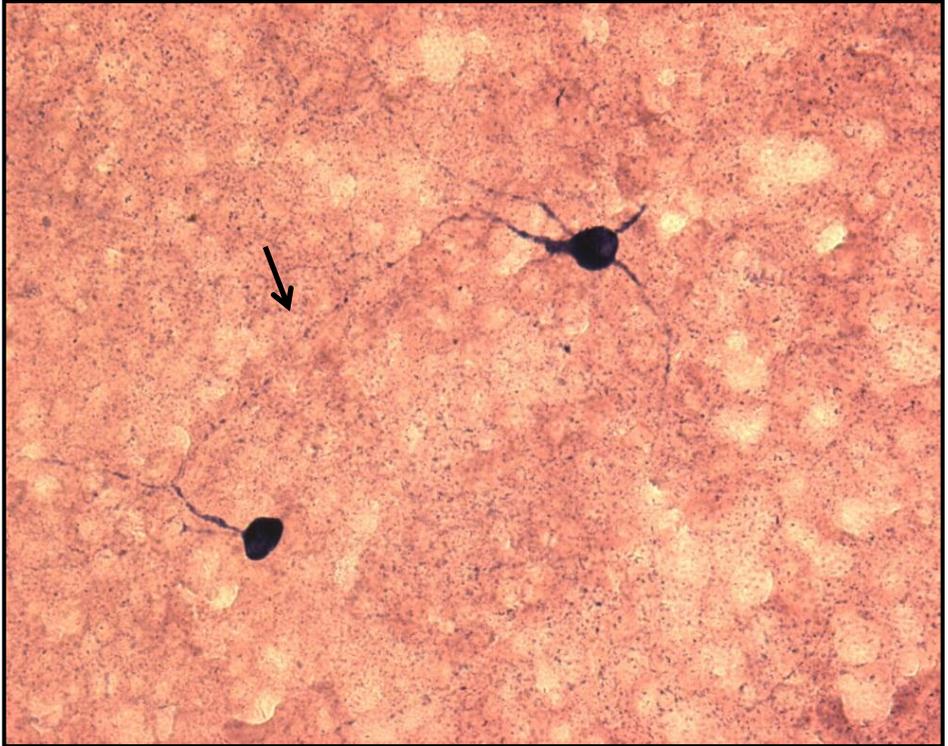
En el estudio morfológico de las neuronas NADPH-d hemos observado que existen neuronas con una mayor o menor intensidad de tinción, como se observa en la imagen siguiente (Fig. IV.23.). Las neuronas de mayor intensidad de tinción tienen una morfología más completa en cuanto a soma y prolongaciones, sin embargo, las de menor intensidad de tinción son más pequeñas y no se aprecian sus prolongaciones. Además, entre las de mayor intensidad de tinción, que podríamos denominar por su forma, verdaderas neuronas, las hay más grandes y son de diferentes formas y las hay más pequeñas, las cuales son mayoritariamente fusiformes.



**Fig. IV.23.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar donde se observan neuronas NADPH-d más teñidas (flechas negras) y menos teñidas (flechas azules). Las más neuronas de mayor tinción son grandes y pequeñas, las de menor tinción son pequeñas

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

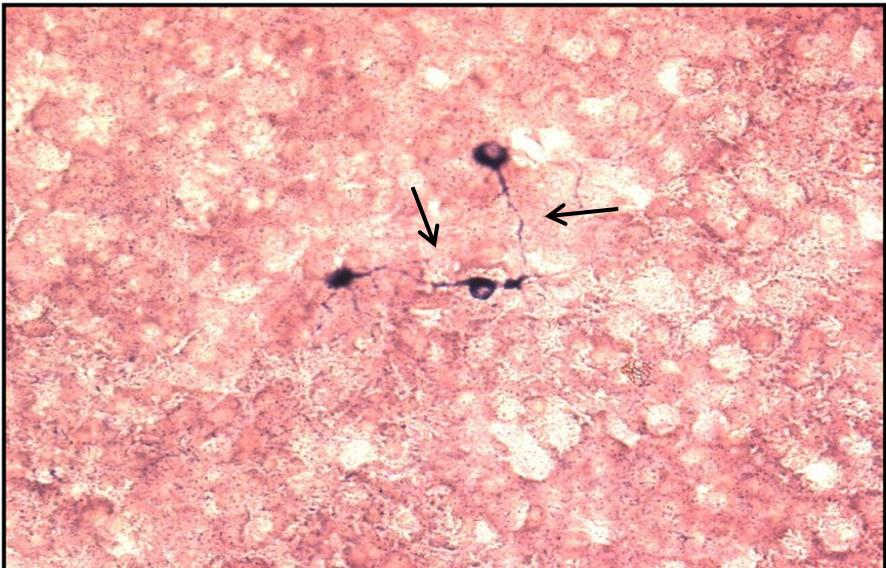
Por otro lado, también se observó en nuestras muestras numerosas neuronas NADPH-d en las que se veían claramente sus relaciones sinápticas entre ellas (Fig. IV.24., Fig. IV.25, Fig. IV.26. y Fig. IV.27.):



**Fig. IV.24.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d donde se observa la relación sináptica entre neuronas NADPH-d (flecha)



**Fig. IV.25.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d donde se observa la relación sináptica entre dos neuronas NADPH-d (flecha)



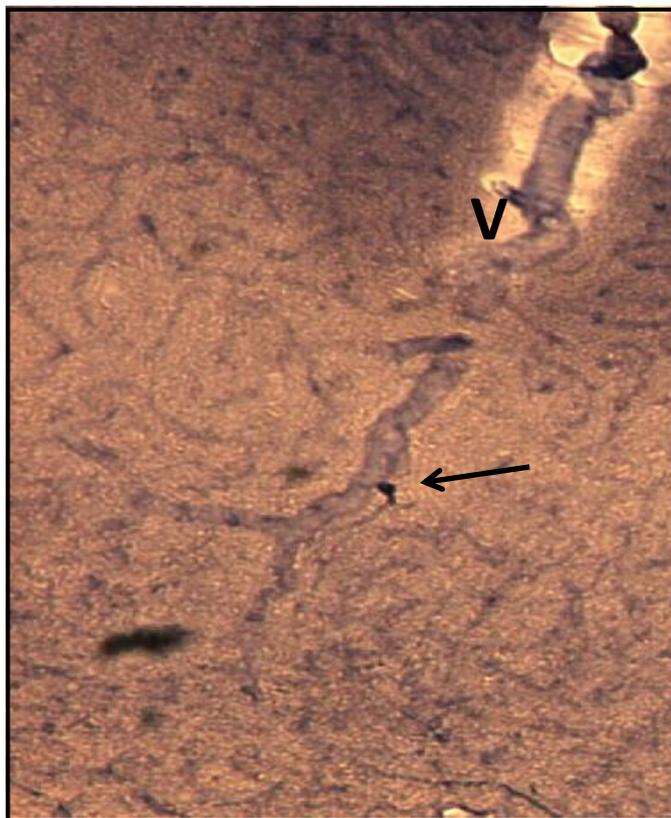
**Fig. IV.26.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d donde se observa la relación sináptica entre neuronas NADPH-d (flechas)



**Fig. IV.27.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar adulta teñido con NADPH-d donde se observa la relación sináptica entre neuronas NADPH-d (flechas)

*Valoración de las neuronas NADPH-d en la corteza visual: Resultados*

Por último, hemos observado además la relación que existe entre estas neuronas y los vasos sanguíneos, en numerosas muestras estas células se encontraban en relación con la vascularización como se ve en las imágenes inferiores (ver Fig. IV.28. y Fig. IV.29). Además, observamos que con esta misma tinción para la NADPH-d se han teñido algunas células endoteliales de los vasos sanguíneos.



**Fig. IV.28.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar adulta teñido con NADHP-d donde se observa la relación una neurona NADPH-d (flecha) y un vaso sanguíneo(V)



**Fig. IV.29.** Corte histológico del área cerebral V1 de rata Wistar donde se observa la relación una neurona NADPH-d (flecha) y un capilar sanguíneo(V).

# **5. Discusión**



## DISCUSIÓN

Como hemos visto en la introducción, en el estudio de las neuronas NADPH-d positivas, existen gran cantidad de trabajos que hablan de ellas: de su morfología, de su función como productoras de óxido nítrico y de su distribución en el Sistema Nervioso Central.

Los animales empleados en este estudio han sido **ratas Wistar** de diferentes edades (ratas de una semana de vida, ratas adultas y ratas viejas) de manera que, hemos podido estudiar los cambios en estas neuronas en relación al **envejecimiento cerebral** a nivel de la Corteza Visual Primaria.

Existen numerosos trabajos para la determinación de células NADPH-d en cualquier área del Sistema Nervioso con la *rata Wistar*, como son los trabajos de Mitrofanis (1989), Roufail (1995), Kim I.B. y Kim K.Y. (2000 y 2002), Villena A. (2003 y 2006), Ouda L. (2003), Palanza L. (2005), Sánchez-Zuriaga D (2007) y más recientemente Junyang Jung (2012) que detallaremos a continuación.

Mitrofanis, en 1989, estudió las células positivas para la NADPH-d a nivel de retina de rata Wistar y en sus conclusiones resaltó su influencia *en el desarrollo retiniano* desde el nacimiento de la rata hasta la edad adulta.

Roufail, en 1995, concluyó en su investigación que el óxido nítrico no sólo intervenía en *procesos de neurotransmisión* sino que asumía un papel como mediador en la **regulación del flujo vascular retiniano**, también

empleó la rata Wistar como animal de experimentación. Nosotros, en nuestro estudio hemos observado en las muestras histológicas, la relación que existe entre las neuronas NADPH-d y los vasos sanguíneos a nivel cerebral visual con lo que, tal y como observaron estos autores a nivel de retina, pensamos que estas neuronas pueden desempeñar un importante papel en la ***mediación de la regulación del flujo sanguíneo cerebral del área visual primaria.***

Kim I.B. y Kim K.Y., en 2000 y 2002, estudiaron también en rata Wistar las células positivas NADPH-d en retina, de manera que en sus conclusiones afirmaron que estas células se están totalmente diferenciadas en el momento en que las ratas abren los ojos, en la segunda semana de vida. Consideraron que estas células intervenían en el ***proceso de maduración de la retina regulando los procesos de proliferación y muerte neuronal*** (tal y como afirmó en sus estudios previos Mitrofanis).

Villena A., en 2003, realizó un estudio en el Ganglio Geniculado Lateral de la rata Wistar en el que se analizaron las células NADPH-d en relación a la edad, efectuando un análisis morfológico y cuantitativo de las mismas. Para ello utilizó ratas de 3, 24 y 26 meses, en las que observó en su morfología, diferentes tipos de neuronas, según *la intensidad de la tinción, el tamaño y la morfología*, y las clasificaron en neuronas tipo A, fuertemente teñidas, con variabilidad de tamaño y morfología, consideradas “neuronas de proyección”; por otra parte neuronas de tipo B, también fuertemente teñidas, de tamaño más pequeño, normalmente de forma fusiforme, consideradas de “circuitos

locales”. Este patrón se observó en las tres edades de las ratas. Nosotros, en nuestro estudio, hemos observado neuronas de tamaños grande y pequeño que eran fuertemente teñidas con prolongaciones dendríticas y axones muy definidos y otras neuronas menos teñidas que eran de tamaño pequeño (probablemente, coincidiendo con estos autores, se trata de neuronas que pertenecerán a circuitos locales de transmisión sináptica). Por otro lado, Villena concluyó según su estudio que existía *un descenso del 36% en el número de neuronas NADPH-d a nivel de Ganglio Geniculado de rata Wistar* en relación a la edad de la rata. En nuestro estudio, hemos observado también a nivel de Corteza Visual Primaria un descenso marcado de neuronas en relación con el envejecimiento en la rata Wistar, y coincidimos con estos autores en que esta ***disminución de neuronas NADPH-d podría afectar al funcionamiento del cerebro en las ratas viejas.***

Por otro lado, en 2006, estos mismos autores, estudiaron estas neuronas NADPH-d en las capas superficiales del *Colículo Superior en ratas Wistar y en este caso no observaron ningún cambio significativo con la edad en el número de neuronas NADPH-d aunque sí se observó una disminución del tamaño del soma neuronal* con el envejecimiento. Así pues, los cambios en este tipo de neuronas difieren según el área cerebral estudiada en relación a la edad y se requieren más estudios que confirmen o no los hallazgos observados por los autores.

Ouda L. en 2003 observó en la rata Wistar una disminución con la edad de la densidad de neuronas NADPH-d en la Corteza Auditiva Primaria. De

manera que existían *menos neuronas de este tipo en las ratas viejas pero por otro lado se producía un aumento de las prolongaciones dendríticas probablemente como mecanismo compensatorio al envejecimiento cerebral*. Así pues, nosotros en nuestro estudio hemos observado también una disminución en la densidad neuronal de neuronas NADPH-d a nivel de corteza visual primaria pero se ha producido *un cambio en la orientación de dichas neuronas respecto a la superficie de la corteza visual*, pensamos, como estos autores, que probablemente se deba a un **fenómeno compensatorio sináptico en respuesta a la menor densidad neuronal**.

Palanza L., en 2005, estudió a nivel de retina los cambios de las células NADPH-d en la rata Wistar. Se observó que existía un pico en la densidad celular de las células NADPH-d a nivel de retina en el momento en que las ratas abrían los ojos tal y como habían observado Kim I.B. y Kim K.Y previamente, con lo que estas células intervienen probablemente de manera decisiva en la maduración de la retina en el proceso de la visión de la rata Wistar. Los autores resaltaron por otro lado, que el *estudio de la distribución de las células NADPH-d puede representar un **sustrato celular para analizar patrones de conectividad neuronal** y que alteración en su distribución podría ser la base de algunas de las patologías de la retina*. En nuestro estudio, pensamos que el analizar la distribución de estas neuronas NADPH-d en las capas corticales de la corteza visual primaria y su orientación puede **aportar información respecto al envejecimiento**

**del área visual cerebral, y al igual que en retina, alteraciones en la distribución o bien en la orientación de estas neuronas NADPH- d podría ser la base de patologías cerebrales visuales.**

Sánchez-Zuriaga en 2007, en el equipo de investigación de la Dra. Rosa Peris de la Facultad de Medicina de Valencia, realizó un trabajo sobre neuronas NADPH-d estudiando los cambios con la edad en el Colículo Inferior y en el Córtex Auditivo de ratas Wistar. Estos autores observaron una disminución del tamaño del soma en el Colículo Inferior (tal y como ocurre en el Colículo Superior) y también una *pérdida de densidad de neuronas NADPH-d a nivel de Corteza Auditiva Primaria* (coincidiendo con lo observado previamente por Ouda L.) *y relacionaron estos cambios con problemas de audición con la edad.* Según nuestro estudio, se produce también una **pérdida en la densidad de las neuronas NADPH-d en la Corteza Visual Primaria de la rata Wistar que podría relacionarse también con problemas visuales en relación al envejecimiento.**

Junyang Jung, en 2012, hizo un análisis según sus propios resultados y los de otros autores del comportamiento de las células NADPH-d con respecto a la edad, en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central . Observó que en cada una de ellas el comportamiento era diferente y específico para cada zona, y que el envejecimiento estaría relacionado con la producción de óxido nítrico. Para este autor, en ratas Wistar no se produjeron cambios en el número de neuronas NADPH-d en relación a la edad a nivel de Ganglio Geniculado Lateral ni a nivel de Colículo Superior (a nivel de Colículo

Superior coincidió por tanto con Díaz y Villena mientras que, sus resultados fueron diferentes a nivel de Ganglio Geniculado Lateral ya que Villena sí encontró una disminución neuronal en esta área). Los autores concluyeron que ***se requieren más estudios que puedan aportar más datos sobre los cambios que se producen en el envejecimiento en este tipo de neuronas pues los cambios en la densidad neuronal son específicos del área cerebral estudiada.***

También tenemos trabajos sobre las neuronas NADPH-d en *hámster* como los de Zhang en 2004. Dicho autor estudió en el hámster dorado recién nacido los efectos de inhibir a la “óxido nítrico sintetasa” productora de óxido nítrico de manera que, en aquellos hámster en los que se inhibía la enzima, aumentó la mortalidad y no se desarrollaron adecuadamente neuronas NADHP-d a nivel de corteza visual primaria. Este autor concluyó que estas *neuronas NAPDH-d podrían influir en fenómenos de apoptosis en el adecuado desarrollo de la maduración de la corteza visual primaria en el hámster.*

Otros autores incluso han realizado trabajos en *humanos* como los de Faro LR (1995) y Shengxiu Li (2006). Faro LR estudió autopsias de cerebro de individuos normales y observó que en humanos esta neuronas NADPH-d positivas se observaban sobre todo en sustancia blanca cerebral y en la capa VI cortical (solamente se analizaron cuatro individuos con lo que se necesitan más estudios para confirmar o no los resultados obtenidos por los autores). Shengxiu Li, por otro lado, estudió la óxido nítrico sintetasa de tipo endotelial

en humanos a nivel de retina utilizando fetos humanos. Este autor concluye que el *óxido nítrico en humanos interviene en los procesos de maduración de la retina (tal y como habían observado otros autores a nivel de retina en la rata Wistar)*.

Aunque los animales más próximos al hombre en la escala evolutiva son los primates, en nuestro caso tuvimos que desechar la idea de trabajar con ellos por la dificultad en la obtención de los mismos. Optamos por la rata Wistar, debido a la disponibilidad de estos animales en el animalario del “Instituto de Biomedicina del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Valencia”, que posee la infraestructura para su manutención en condiciones óptimas y porque en este animal, el SNC está muy sistematizado con el mapa topográfico de Paxinos.

Como ya explicamos en la introducción, el **óxido nítrico** es un gas que se sintetiza en distintas células de organismo y que tiene un **papel crucial como molécula de señalización celular**. Este gas interviene en los sistemas de transducción de señales que son especialmente relevantes en el cerebro y en el sistema cardiovascular. La síntesis del óxido nítrico, se realiza por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), a partir del aminoácido L-arginina. La NADPH actúa como cofactor en esta reacción.

El óxido nítrico desempeña un importante papel en el proceso de **envejecimiento**. La presencia de radicales libres en las células, producen daños oxidativos y éstas acaban progresando hacia la muerte, bien por

mecanismo de apoptosis (fisiológicos) o mediante necrosis (patológicos) (Rodrigo y cols., 1998). Esta muerte celular acaba deteriorando el tejido y órgano al que pertenezcan. Nosotros, en nuestro estudio, hemos encontrado una disminución de células productoras de óxido nítrico, conforme avanzábamos en la edad de las ratas.

Según Vincent y Hope 1991, la NOS, se encuentra distribuida en diferentes tejidos del organismo y tiene varias isoformas: neuronal, endotelial e inducible.

La NOS-neuronal es la que se encuentra relacionada con la NADPH-d y está ampliamente distribuida por el SNC (Kuonen 1988, Saffrey 1992 y Schmidt 1992)

En la actualidad es posible detectar indirectamente la presencia de NOS-neuronal mediante dos tipos de procesos:

- Anticuerpos específicos contra la NOS-neuronal purificada (Bredt 1990)
- Mediante técnica histoquímica, para la detección de la NADPH-d (Hope.1991)

Bredt y cols.,(1991); Hope, y cols., (1991); Dawson,(1991), han podido comprobar que la NADPH-d y la NOS se han localizado en las mismas

poblaciones neuronales y que su actividad es paralela en la producción de óxido nítrico y GMPc, por lo que la identificación de la NOS como la enzima responsable de la reacción histoquímica de la NADPH-d, ha hecho posible hacer un detallado mapa de esta enzima a través del SNC.

Por este motivo, nosotros hemos utilizado **la técnica histoquímica de la NADPH-d**, para el estudio de las **neuronas productoras de óxido nítrico**, de esta manera, mediante dicha técnica hemos teñido solamente aquéllas neuronas productoras de óxido nítrico pudiendo estudiarlas y analizar sus cambios evolutivos con la edad de la rata.

En cuanto a su morfología, según Southam (1991) en el SNC el óxido nítrico es sintetizado por neuronas de axón corto, sin embargo también las células de axón largo tienen actividad NADPH dependiendo de diferentes niveles del SNC. Nosotros hemos encontrado neuronas con axón corto y largo aunque no podemos definirnos sobre la función de cada una de ellas, en particular, porque no era nuestro estudio.

En 1986 Sandell fue el primero en describir en cerebros de mono dos tipos de células positivas para la NADPH-d, unas con fuerte tinción y otras más débilmente teñidas. Para Wolf (1992) este tipo de marcado más débil se debe a que se trata de células en donde se detecta la actividad en las mitocondrias pero no en el citoplasma. A la misma conclusión llegó Aoki en 1993, y Lüth en 1994, en cerebro humano. Nosotros hemos encontrado también diferentes intensidades de tinción de la NADPH-d. Hemos observado

neuronas con ***menor intensidad de tinción que eran más pequeñas y neuronas con mayor intensidad de tinción de diferentes tamaños y con somas y prolongaciones muy bien definidos.***

También Lee y Chang-Jin en 2004 trabajaron en cerebro de hámster, y en 2005 lo realizaron en corteza de rata y conejo, en ellos estudiaron la morfología de las neuronas que contenían el enzima NOS y también diferenciaron dos tipos de coloración, las más teñidas que denominaron Tipo 1 y las menos teñidas que denominaron Tipo 2. En cuanto a la descripción morfológica de las neuronas, se basaron en el estudio solamente aquellas que estaban más teñidas, ya que se podían diferenciar claramente tanto el soma como las dendritas y así encontraron como Villena, neuronas más grandes y polimorfas y neuronas más pequeñas de tipo fusiforme, dispuestas en posición horizontal o vertical.

Nosotros en nuestro estudio, también encontramos estos dos tipos de neuronas, unas grandes de diversa morfología, y otras más pequeñas de tipo fusiforme. También hemos estudiado las de mayor tamaño, y el patrón se repetía en todas las edades de la rata.

Lúth en 1994 en su estudio en cerebro humano, encuentra neuronas NADPH-d en íntima relación con los vasos sanguíneos, relacionando el óxido nítrico con la vascularización a nivel cortical. A la misma conclusión llegaron Moro (1995) en ratas y Yan (1996) en monos. Rockhil R.L. en su trabajo (2000), realizado en retina de conejos, observa que en la tinción para

NADPH, se teñían tanto los cuerpos y los procesos de las células amacrinias, así como las células de los vasos retinianos. Dicha autora también refleja en su estudio que el óxido nítrico de origen neuronal juega un papel importante en la actividad de interrelación neural a nivel de la retina, en la regulación del flujo sanguíneo y en el metabolismo retiniano. Esto sugiere que dicho papel puede desempeñarse también a nivel cerebral, que ya Dirnagl en 1994 relacionaba el óxido nítrico y la adenosina con la regulación del flujo sanguíneo a nivel cerebral.

Nosotros, aunque nuestro estudio es en **corteza visual primaria de ratas Wistar**, estamos de acuerdo con estos autores, puesto que hemos encontrado **neuronas NADPH-d que están en íntima conexión con vasos sanguíneos** y además, con esta misma tinción se han mostrado células endoteliales de los vasos. Este hallazgo a nivel de corteza visual primaria no lo hemos encontrado en la bibliografía en ningún estudio previo en la rata Wistar.

También encontramos en nuestras muestras, numerosas neuronas NADPH-d en las que se ve claramente las **relaciones sinápticas** que existen entre ellas, hecho que no hemos constatado en la bibliografía revisada. Así pues, podemos observar en numerosas muestras de nuestro estudio **las prolongaciones axonales y dendríticas en íntima relación entre diversas neuronas NADPH-d en la corteza visual**

**primaria de la rata Wistar** de manera que, se puede observar el sustrato morfológico de la transmisión sináptica entre este tipo de neuronas.

En la bibliografía no hemos encontrado ningún trabajo que investigue los cambios evolutivos de este tipo de neuronas a nivel de córtex visual primario en relación a la edad de manera que, no podemos comparar nuestros resultados con los de otros autores en esta área.

En nuestro estudio cuantitativo de las neuronas NADPH-d en la corteza visual primaria (V1) de las ratas, encontramos una disminución de las neuronas horizontales según avanzamos en la edad, afectando esta pérdida de neuronas a las capas más superficiales. También hay un descenso en el número total de neuronas verticales, pero en el caso de estas neuronas afecta más a las capas profundas. En cuanto a los axones, hay una disminución del total de axones con respecto a la edad, y esta disminución es más acentuada en las capas superficiales en los axones horizontales, y por el contrario más acentuada su disminución en las capas profundas en cuanto a los axones verticales. Por lo tanto no podemos comparar nuestro estudio con otros autores en lo referente al recuento por capas en la V1 de las neuronas NADPH-d, ya que no hemos encontrado ninguna referencia al respecto. Lo que sí que parece quedar claro es que el envejecimiento del SNC estaría relacionado con la mayor o menor producción de óxido nítrico, y que esta producción estaría relacionada con el aumento o disminución de las neuronas NADPH-d y de los cambios en la ordenación de sus prolongaciones.

Todos nuestros resultados parecen sustentar la hipótesis de trabajo sobre la importancia de la morfología, densidad y localización de las neuronas NADPH-d en el área visual primaria.

Hemos confirmado los cambios en estas neuronas en el área visual a través de las etapas de la vida de la rata Wistar. Todo tejido en desarrollo está sometido a procesos de proliferación, migración, adhesión intercelular, diferenciación y supervivencia que se reflejan en la actividad celular. Para estos procesos, son necesarias las cascadas de señalización neuronal mediante las sinapsis. De estos hallazgos deriva un concepto interesante en relación a la posibilidad de que estas neuronas estén implicadas en la regulación de la transmisión sináptica a este nivel.

Nuevos estudios en este sentido deberían estar encaminados en un futuro a analizar este hecho mediante el uso de marcadores específicos de las sinapsis como la Sinaptofisina y también un marcaje doble con el MAP 2 Y Faloidina-Rodamina (marcador de la actina en los conos de crecimiento) así como con la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) lo que nos podría ayudar a confirmar nuestros hallazgos.



# **6. Conclusiones**



## CONCLUSIONES

La realización del estudio experimental propuesto nos ha llevado a la obtención de las siguientes conclusiones:

1.- Se evidencia una **disminución progresiva de la densidad de neuronas NADPH-d en el área visual primaria** en las diferentes etapas de la vida de la rata Wistar. Ello coincide con la **menor observación de axones**. Esta disminución podría estar relacionada con el **envejecimiento del área V1**.

2.- Se han identificado las neuronas NADPH-d a nivel de las tres capas estudiadas en el área visual primaria con dos tipos de orientación: paralelas a la superficie de la corteza visual u **horizontales** y perpendiculares a la misma o **verticales**. Pensamos que la **orientación y distribución en las capas corticales de V1** de las neuronas NADPH-d viene determinada **según la función de las neuronas corticales de cada capa**; en donde las neuronas NADPH-d contribuyen a la **neuromodulación de la transmisión sináptica**.

3.- En los tres grupos cronológicos se han encontrado **mayor proporción de neuronas NADPH-d verticales a nivel de las capas superficiales** de la corteza visual primaria de la rata Wistar. Estas neuronas

podrían ser las que *facilitarían la transmisión a las áreas vecinas de la corteza cerebral.*

4.- En los tres grupos de edad creciente se constatan las neuronas ***NADPH-d horizontales en un número más elevado en las capas medias y en las capas profundas*** de la corteza visual primaria de la rata Wistar.

5.- En el grupo de ratas recién nacidas, de forma global, las neuronas NADPH-d verticales son más numerosas a diferencia de lo que ocurre en las ratas adultas y viejas que poseen una mayor proporción de neuronas NADPH-d horizontales, dentro de una población total menor. Deducimos por ello, que se produce un *cambio en la orientación de parte de las neuronas verticales como fenómeno adaptativo al envejecimiento.* Ello puede ser considerado como ***diferencias en la plasticidad neuronal para conseguir mayor potencialidad sináptica.***

6.- La relación observada en nuestro estudio de neuronas NADPH-d con los vasos y capilares sanguíneos corticales, pensamos confirma la función de estas neuronas como ***reguladoras del flujo sanguíneo cerebral a nivel de V1.***

# **7. Bibliografía**



## **BIBLIOGRAFÍA**

**Aoki C.**, Fenstermaker, S., Lubin, M., and Go, C.-G. Nitric oxide synthase in the visual cortex of monocular monkeys as revealed by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Brain Res.* 1993; 620, 97–113.

**Aoki C**, Rhee J, Lubin M, Dawson TM. NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res.* 1997 Mar 7; 750(1-2):25-40

**Baker HJ**, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The Laboratory Rat. Vol. I, 1979* (Baker, Lindsey, Weisbroth Eds.) Academic Press, New York (USA). *Toxicological Sciences* 2007 95:443-451

**Balaratnasingam C**, Ye L, Morgan WH, Bass L, Cringle SJ, Yu DY. Protective role of endothelial nitric oxide synthase following pressure-induced insult to the optic nerve. *Brain Res.* 2009 Mar 31;1263:155-64. Epub 2009 Jan 30.

**Bredt DS**, Glatt CE, Hwang PM, Fotui M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. *Neuron* 1991 Oct;7(4):615-24.

**Bredt DS**, Zinder SH. 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.

**Calabrese V**, Bates TE, Stella AM. 2000. NO synthase and NOdependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 25:1315-1341.

**Cudeiro J, C. Rivadulla**. La vista y el conocimiento - sobre el papel fisiológico del óxido nítrico en el sistema visual *Tendencias Neurosci.* 1999 Mar; 22 (3) :109-16.

**Cheon E**, Park C, Kang S, Cho G, Yoo J, J. Song, W. Choi, Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol, *Neurosci. Lett.* 330 (2002) 265- 268.

**Chun MH**, Oh S.J., IKim I.B., Kim K.Y., Light and electron microscopical analysis of nitric oxide synthase-like immunoreactive neurons in the rat retina, *Vis. Neurosci.* 16 (1999) 379– 389.

**Clause BT**. The Wistar Rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *J Hist Biol.* 1993 Summer;26(2):329-49.

**Coleman PD**, Flood DG. Neuron numbers and dendritic extent normal aging and Alzheimer' disease. *Neurobiol Aging* 1987; 8:521–545.

**Corbett J. A.**, Tilton, R. G., Chang, K., Hasan, K. S., Ido, Y., Wang, J. L., Sweetland, M. A., Lancaster, J. R., Jr., Williamson, J. R. & McDaniel, M. L. (1992) *Diabetes* **41**, 552–556.

**Dawson TM**, Bredt DS, Fotuhi M, Huang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.

**Dawson VL**, Dawson TM. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int.* 1996; 29:97–110

**Díaz F, Villena A**, Vidal L, Moreno M, De Vargas IP. NADPH-diaphorase activity in the superficial layers of the superior colliculus of rats during aging *Microsc Res Tech.* 2006 Jan; 69(1):21-8

**Dirnagl U.**, K. Niwa, U. Lindauer, A. Villringer, Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide, *Am. J. Physiol.* 267 .1994. H296–H301.

**Ducommun D.** Breeding Rats. En: *Rats. Practical, Accurate Advice from the Expert.* Bowtie Press Ed. 2002 USA.

**Edelman GM**, Gally JA. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):11651-2.

**Ellison DW**, Kowall NW, Martin JB. Subset of neurons characterized by the presence of NADPH-diaphorase in human substantia innominata. *J Comp Neurol.* 1987 Jun 8;260(2):233-45.

**Faro LR**, Araujo R, Araujo M, Do-Nascimento JL, Friedlander MJ, Picanço-Diniz CW Localization of NADPH-diaphorase activity in the human visual cortex. *Braz J Med Biol Res.* 1995 Feb;28(2):246-51.

**Förstermann U**, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD et al. Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1649-1857.8. *J Neurosci.* 1999 Jul 1;19(13):5528-48.

**Gabbott P.L.A.**, Bacon, S.J., 1994. An oriented framework of neuronal processes in the ventral lateral geniculate nucleus of the rat demonstrated by NADPH diaphorase histochemistry and GABA immunocytochemistry. *Neuroscience* 60, 417\_/440.

**Gally JA**, Montaque PR, Reeke GN jr., Edelman GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1990 May; 87(9):3547-51.

**Garthwaite J.** Concepts of neural nitric oxide mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27:2783-2802

**Gonchar, Y.** and Burkhalter, A., 1997. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex* 7, 347-358.

**González-Hernández T,** Conde-Sendín M, Meyer G. Laminar distribution and morphology of NADPH-diaphorase containing neurons in the superior colliculus and underlying periaqueductal gray of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 1992 Aug;186(3):245-50

**González-Hernández T,** Conde-Sendín, M., González-González, B., Mantolán-Sarmiento, B., Pérez-González, H., Meyer, G., 1993. Postnatal development of NADPH-diaphorase activity in the superior colliculus and the ventral lateral geniculate nucleus. *Dev. Brain Res.* 76, 141-145.

**González-Hernández T,** Mantolán-Sarmiento, B., González-González, B., Ferres-Torres, R., Meyer, G., 1994. NADPH-d (dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase)

activity in geniculo-tectal neurons of the rat. *Neurosci. Lett.* 167, 77\_/80.

**Harsanyi K., Friedlander MJ.** Transient Synaptic Potentiation in the Visual Cortex. II. Developmental Regulation. *J Neurophysiol* 77:1284-1293, 1997.

**Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR.** Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2811-2814

Hope BT, Vincent SR. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J Histochem Cytochem* 1994; 37: 653-661.

**Hubel David J. (enero 2005) :”Eye, Brain and Vision”.**

**Huh Y., Kim, C., Cho, J., Lee, W., Kim, J., Ahn, H., 1997b.** Differential effects of aging on NADPH-diaphorase and VIP neurons in cerebral cortex of rats. *NeuroReport* 8, 2991\_/2994.

**Huh Y.**, Kim, C., Lee, W., Kim, J., Ahn, H., 1997a. Age-related change in the neuropeptide Y and NADPH-diaphorase-positive neurons in the cerebral cortex and striatum of aged rats. *Neurosci. Lett.* 223, 157\_/160.

**Ingram DK**, Spangler E, Iijimas S, Ikari H, Kuo H, Greig NH, London ED. 1994. Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. *Life Sci* 55:2037–2049.

**Jenner P.** Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 1: 24-34.

**Junyang Jung**, Changyun Na, and Youngbuhm Huh. Alterations in Nitric Oxide Synthase in the Aged CNS. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 718976.

**Kara P, Friedlander MJ.** Arginine analogs modify signal detection by neurons in the visual cortex. *J Neurosci.* 1999 Jul 1;19(13):5528-48.

**Kim IB**, E.J. Lee, K.Y. Kim, W.K. Ju, S.J. Oh, C.K. Joo, M.H. Chun, Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the mammalian retina, *Neurosci. Lett.* 4 (1999) 193–19

**Kim IB**, Oh SJ, M.H. Chun, Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina, *Microsc. Res. Tech.* 15 (2000) 112–123.

**Kim KY**, J.I. Moon, E.J. Lee, Y.J. Lee, I.B. Kim, C.K. Park, S.J. Oh, M.H. Chun, The effect of l-Arginine, a nitric oxide synthase substrate, on retinal cell proliferation in the postnatal rat, *Dev. Neurosci.* 24 (2002) 313–321.

**Kim KY**, W.K. Ju, S.J. Oh, M.H. Chun, The immunocytochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the developing rat retina, *Exp. Brain Res.* 133 (2000) 419–424.

**Kuo, H.**, Hengemihle, J., Ingram, D.K., 1997. Nitric oxide synthase in rat brain: age comparisons quantitated with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Gerontol.* 52, 146\_/151.

**Kuonen DR**, Kemp MC, Roberts PJ. Demonstration and biochemical characterisation of rat brain NADPH-dependent diaphorase. *J. Neurochem.* 1988; 50: 1017-1025.

**Lee JE**, Ahn CH, Lee JY, Chung ES, Jeon CJ. Nitric oxide synthase and calcium-binding protein-containing neurons in the hamster visual cortex. *Mol Cells.* 2004 Aug 31; 18(1):30-9

**Lee JE**, Jeon CJ. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-containing neurons in mouse and rabbit visual cortex and co-localization with calcium-binding proteins. *Mol Cells.* 2005 Jun 30; 19(3):408-17

**Lolova, I.S.**, S.R., Itzev, D.E., 1996. Changes in NADPHdiaphorase neurons of the rat laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in aging. *Mech. Ageing Dev.* 90, 111\_/128.

**Luksch A.**, Polak K. , Beier C., Polska E., Wolzt M., Guido T. Dorner, Hans-Georg Eichler and Leopold Schmetterer Choroidal and Optic

Nerve Head Blood Flow in Healthy Subjects *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3080–3084

**Lüth HJ**, Hedlich A, Hilbig H, Winkelmann E, Mayer B  
Morphological analyses of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex. *J Neurocytol.* 1994 Dec; 23(12):770-82.

**Lüth, H.-J.**, Hedlich, A., Hilbig, H., Winkelmann, E., and Mayer, B. Morphological analyses of NADPH-diaphorase/ nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex. *J. Neurocytol.* 1994; 23, 770–782.

**May CA.** Age-dependent morphology of NADPH diaphorase-positive amacrine cells in the mouse retina. *Anat Histol Embryol.* 2012 Dec; 41(6):476-8.

**Mayer B**, Jhon M, Böhme E. Purification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* 1990 Dec 17;277(1-2):215-9.

**Meyer G. y González-Hernández T.** Bases experimentales para el estudio del Sistema Nervioso. Universidad de Sevilla, (octubre 1993). Tomo I. Editores: J. A. Armengol, F.J. Miñano Capítulo: Histoquímica de la NADPH-diaforasa, su utilidad en neurociencias

**Meyer G., González-Hernández T., Galindo-Mireles D., Castañeira-Perdomo A., Ferres-Torres R.** The efferent projections of neurons in the white matter of different cortical areas of the adult rat. *Anat Embryol.* 1991; 184: 99 -102.

**Mitrofanis J.** Development of NADPH-diaforase cells in the rat's retina. *Neurosci Lett.* 1989 Jul 31; 102(2-3):165-72

**Mitrofanis, J., 1992.** NADPH-diaforase reactivity in the ventral and dorsal lateral geniculate nuclei of rats. *Visual Neurosci.* 9, 211-216.

**Moncada S,** Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109- 142, 1991.

**Mufson EJ**, Brady DR, Carey RG. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) histochemistry in the hippocampal formation of the New World monkey (*Saimiri sciureus*) Brain Res. 1990 May 21; 516(2):237-47.

**Nathan C**, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269: 13725-1372.

**Neufeld AH**, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115:497-503

**Neufeld AH**, S. Shareef, J. Pena, Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina, J. Comp. Neurol. 416 (2000) 269-275.

**Neufeld AH**, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 17; 96(17):9944-8

**Norris PJ**, Waldvogel HJ, Faull RL, Love DR, Emson PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 1996; 4: 1037-1047.

**Oh SJ**, I.B. Kim, M.Y. Lee, M.H. Chun, J.W. Chung, NOS-like immunoreactive neurons express GAB-like immunoreactivity in rabbit and rat retinae, *Exp. Brain Res.* 120 (1998) 109–113.

**Okuno T**, Oku H, Sugiyama T, Ikeda T. Glutamate level in optic nerve head is increased by artificial elevation of intraocular pressure in rabbits. *Exp Eye Res.* 2006 Mar;82(3):465-70

**Ouda L**, Nwabueze-Ogbo FC, Druga R, Syka J. NADPH-diaphorase-positive neurons in the auditory cortex of young and old rats. *Neuroreport.* 2003 Mar 3; 14(3):363-6.

**Palanza L.**, Jhaveri S., Donati S., Nuzzi R., Vercelli A. Quantitative spatial analysis of the distribution of NADPH-diaphorase-positive

neurons in the developing and mature rat retina, Brain Research Bulletin 65 (2005) 349-360

**Park, H.-J.**, Hong, S.-K., Kong, J.-H., and Jeon, C.-J. 1999. Localization of calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in mouse and hamster visual cortex. Mol. Cells 9, 542–547.

**Park, H.-J.**, Lee, S.-N., Lim, H.-R., Kong, J.-H., and Jeon, C.-J., 2000. Calcium-binding protein calbindin D28K, calretinin, and parvalbumin immunoreactivity in the rabbit visual cortex. Mol. Cells 10, 206–212.

**Patel JI**, Gentleman SM, Jen LS, Garey LJ, Nitric oxide synthase in developing retinas and after optic tract section, Brain Res. 761 (1997) 156–160.

**Perez MT**, Larsson B, Alm P, Andersson KE, Ehinger B, Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas, Exp. Brain Res. 104 (1995) 207–217.

**Petropoulos IK**, Pournaras JA, Stangos AN, Pournaras CJ. Effect of systemic nitric oxide synthase inhibition on optic disc oxygen partial pressure in normoxia and in hypercapnia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jan; 50(1):378-84. Epub 2008 Aug 1.

**Philippu A**, Prast H. : Role of histaminergic and cholinergic transmission in cognitive processes. *Drug News Perspect*. 2001 Nov;14(9):523-9.

**Prast H**, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*. 2001 May; 64(1):51-68.

**Provis J M**, Mitrofanis J. NADPH-diaphorase neurones of human retina have a uniform topographical distribution, *Vis. Neurosci*. 4 (1990) 619–623.

**Rockhill R.L.**, T. Euler, R.H. Masland, Spatial order within but not between types of retinal neurons, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 2303–2307

**Rodrigo J**, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, López JC, Encinas JM, Fernández Vizarra P, Castro S, Peinado MA, Pedrosa JA, Richard A, Martínez-Murillo, Santacan M, Bentura ML, Uttenthal RLO. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. An sist sanit Navar. 2000; 23 (2) 193-236.

**Rodrigo J**, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttenthal LO, Higgs EA, Fernández AP et al. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema and blood vessels of the rat brain. J Comp Neurol 1997; 378: 522-534

**Rodrigo J**, Springall D, Uttenthal LO, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. Philos Trans R Soc Lond B 1994; 345: 175-221.

**Roufail E**, Rees S, Ageing has a differential effect on nitric oxide synthase-containing and catecholaminergic amacrine cells in the human and rat retina, J. Comp. Neurol. 389 (1997) 329–347.

**Roufail E.**, M. Stringer, S. Rees, Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina, *Brain Res.* 684 (1995) 36–46.

**Saffrey MJ**, Hassal CJS, Hoyle CHV, Belai A, Moss J, Schmidt HHW, Försterman U, Murad F, Burnstock C. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in culture myenteric neurons. *Neuroreport* 1992; 3: 333-336

**Sánchez-Zuriaga D**, Martí-Gutiérrez N, De La Cruz MA, Peris-Sanchis MR. Age-related changes of NADPH-diaphorase-positive neurons in the rat inferior colliculus and auditory cortex. *Microsc Res Tech.* 2007 Dec; 70(12):1051-9.

**Sandell JH.** NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex *J Comp Neurol.* 1986 Sep 15; 251(3):388-97.

**Schmidt HHW**, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. Mapping of neural nitric oxid shyntase 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.* 1992; 40: 1439-1456.

**Schmidt K**, Klatt P, Mayer B. Uptake of nitric oxide synthase inhibitors by macrophage RAW 264.7 cells. *Biochem J.* 1994; Jul 15; 301 (Pt 2):313-6.

**Schuman EM**, Madison DV. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254: 1503–1506.

Serrano J, Encinas JM, Fernández AP, Rodrigo J, Martínez A. Effects of acute hypobaric hypoxia on the nitric oxide system of the rat cerebral cortex: Protective role of nitric oxide inhibitors. *Neuroscience.* 2006 Oct 27; 142(3):799-808.

**Shareef S.**, Sawada A., Neufeld A. H. Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Optic Nerves of Rat Eyes with Chronic Moderately Elevated Intraocular Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 2884–2891

**Shengxiu Li**, David Tay, Siyun Shu, Xinmin Bao, Yongming Wu, Xiaoyang Wang, and Henry K. Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Amacrine Cells of Developing Human Retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2006; 47:2141-2149

**Sherman MP**, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis. *Med Hypothesis* 1992; 39: 143-146

**Skinner RD**, Conrad C, Henderson V, Gilmore SA, Garcia-Rill E. Development of NADPH diaphorase-positive pedunculopontine nucleus neurons. *Exp Neurol*. 1989 Apr; 104(1):15-21

**Smith MA**, Vasak M, Knipp M, Castellani RJ, Perry G. Dimethylargininase, a nitric oxide protein, in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 898-902.

**Southam E**, Garthwaite J. Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *Neuroreport*. 1991 Nov; 2(11):658-60

**Sugiyama T.**, Hidehiro Oku, Shoichiro Ikari, and Tsunehiko Ikeda  
Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Optic Nerve Head  
Circulation in Conscious Rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;  
41:1149–1152

**Terada H**, Nagai T, Kimura H, Kitahama K, Okada S. Distribution of  
nitric oxide synthase immunoreactive neurons in fetal rats brains at  
embryonic day 15 and day19. *J Chem Neuroanat.* 1996; 10(3-4):273-8.

**Thomas E., Pearse AGE.** The fine localization of dehydrogenases in  
the nervous system. *Histochemistry*1961; 2: 266-282.

**Vernet D**, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C.  
1998. Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the  
hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology*  
139:3254–3261.

**Vidal L**, Díaz F, Villena A, Moreno M, Campos JG, de Vargas IP.  
Nitric oxide synthase in retina and optic nerve head of rat with

increased intraocular pressure and effect of timolol. *Brain Res Bull.* 2006 Oct 16; 70(4-6):406-13. Epub 2006 Aug 7

**Villena A, Díaz F,** Vidal L, Moreno M, Pérez de Vargas I. Quantitative age-related changes in NADPH-diaphorase-positive neurons in the ventral geniculate nucleus, *Neuroscience Research* 46 (2003) 63 – 72

**Vincent SR,** Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46: 755-784.

**Vincent SR,** Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neurosci Lett.* 1983 Dec 23; 43(1):31-6

**Wallace MN.** Relationship of afferent inputs to the lattice of high NADPH-diaforase activity in the mouse superior colliculus. *Exp Brain Res.* 1989; 78: 435- 445.

**Werner-Felmayer G**, Werner ER, Fuchs D., Hausen A, Reibnegger G, Watcher H. On multiple forms of NO synthase and their occurrence in human cells. *Res. Immunol.* 1991; 142: 555- 561.

**Wiencken AE and V.A. Casagrande**, The Distribution of NADPH Diaphorase and Nitric Oxide Synthetase in Relation to the Functional Compartments of Areas V1 and V2 of Primate Visual Cortex (2000) Oxford University Press, Departments of Cell Biology, Psychology and Ophthalmology and Visual Sciences, Vanderbilt University , 37232 - 2175

**Wiencken AE, Casagrande VA** Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia.* 1999 Jun; 26(4):280-90.

**Wolf G**, Würdig S, Schünzel G. Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity. *Neurosci Lett.* 1992 Nov 23; 147(1):63-6

**Wolf G.** Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol.* 1997 Jan; 12(1):251-61.

**Wong-Riley MT,** Huang Z, Liebl W, Nie F, Xu H, Zhang C. Neurochemical organization of the macaque retina: effect of TTX on levels and gene expression of cytochrome oxidase and nitric oxide synthase and on the immunoreactivity of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase and NMDA receptor subunit I. *Vision Res.* 1998 May;38(10):1455-77

**Yamada K,** Nabeshima T. 1998. Changes in NMDA receptor/nitricoxide signalling pathway in the brain with aging. *Microsc Res Tech*43:68–74.28

**Yan XX,** Garey LJ, Liang Y, von Bussmann KA, Jen LS Increased expression of NADPH-diaphorase in visual centres after unilateral optic nerve transection in the rat. *J Hirnforsch.* 1995; 36(4):485-8.

**Yan XX,** Jen LS, Garey LJ. NADPH-diaphorase-positive neurons in primate cerebral cortex colocalize with GABA and calcium-binding proteins *Cereb Cortex.* 1996 May-Jun; 6(3):524-9.

**Yew DT**, Wong HW, Li WP, Lai HW, Yu WH. Nitric oxide synthase in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1999; 89: 675-686.

**Yousef T**, Neubacher U, Eysel UT, Volgushev M. Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004, Apr; 13(1):57-67.

**Zhang Y**, Zhang J, Zhao B. Nitric oxide synthase inhibition prevents neuronal death in the developing visual cortex. *Eur J Neurosci.* 2004 Nov; 20(9):2251-9.

