

T. D. 261

UNIVERSITAT DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEP. DE BIOLOGIA ANIMAL, CELULAR,
GENÉTICA Y PARASITOLOGIA

ANÁLISIS DE LAS PROYECCIONES DEL
CORTEX DORSOMEDIAL Y DEL CORTEX
DORSAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE
Gallotia stehlinii y Podarcis
hispanica (LACERTIDAE, SQUAMATA,
REPTILIA)

Memoria que presenta el
licenciado D. Francisco Olucha
Bordonau para acceder al Título de
Doctor en Ciencias Biológicas

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
VALENCIA

Burjassot, Julio de 1987

UMI Number: U607639

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607639

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Pr. 18706156.

R. 6022

A una persona maravillosa

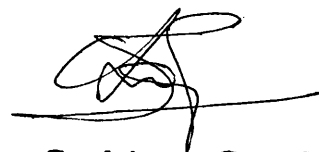
María Dolores

D. CARLOS LOPEZ GARCIA, Catedratico de Citologia e Histologia del Departamento de Biologia Animal, Celular, Genetica y Parasitologia de la Facultad de Ciencias Biologicas de la Universitat de Valencia

TENGO EL HONOR DE INFORMAR:

Que D. FRANCISCO OLUCHA BORDONAU ha realizado bajo mi dirección los trabajos conducentes a la elaboración de la memoria titulada "ANALISIS DE LAS PROYECCIONES DEL CORTEX DORSOMEDIAL Y DEL CORTEX DORSAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE Gallotia stehlinii y Podarcis hispanica (LACERTIDAE, SQUAMATA, REPTILIA)" que presenta para optar al titulo de Doctor y que ha terminado con el máximo aprovechamiento.

BURJASSOT a 27 de Julio de 1987



Fdo. C. López García

INDICE

INTRODUCCION

1.1.- Estructura general del telencéfalo de reptiles....	2
1.2.- Organización general de la corteza cerebral de reptiles.....	5
1.3.- Conexiones de la corteza cerebral de reptiles Squamata.....	8
1.3.1.- Conexiones intracorticales.....	9
1.3.2.- Eferencias extracorticales.....	11
1.3.3.- Aferencias extracorticales.....	13
1.3.4.- Comparación con otros ordenes de reptiles.....	15
1.4.- El sistema Timm positivo de reptiles y mamiferos..	16
1.5.- Planteamiento del trabajo y objetivos.....	20

MATERIAL Y METODOS

2.1.- Ejemplares de experimentación.....	29
2.2.- Inyección estereotáxica de HRP.....	29
2.2.1.- El aparato de estereotaxia.....	29
2.2.2.- Preparación y llenado de micropipetas...	31
2.2.3.- La solución de HRP.....	31
2.2.4.- La intervención quirúrgica.....	32
2.2.4.1.- Preparación del campo de inyección.....	32
2.2.4.2.- Implantación de la micropipeta.	33

2.2.4.3.- Sellado de la herida.....	34
2.2.4.4.- Tiempo de supervivencia.....	34
2.3.- Fijación.....	35
2.3.1.- Soluciones utilizadas.....	35
2.3.2.- Perfusion.....	36
2.3.3.- Extracción del cerebro.....	36
2.3.4.- Postfijación y lavado.....	37
2.4.- El revelado de la HRP.....	38
2.4.1.- Microtomía de congelación.....	38
2.4.2.- Reacción histoquímica.....	38
2.4.2.1.- El método de DAB.....	39
2.4.2.2.- El método de TMB-NPS.....	40
2.4.2.3.- El método de TMB-HMA.....	42
2.4.3.- Montaje de las series y tinción de con- traste.....	44
2.5.- Estudio de las series.....	46

RESULTADOS

3.1.- La técnica.....	54
3.1.1.- Area de difusión.....	54
3.1.2.- Tiempos de supervivencia.....	55
3.1.3.- Detección de la traza.....	56
3.2 .- Descripción citoarquitectónica de las áreas dor- somedial y dorsal.....	62
3.2.1.- El cortex dorsomedial.....	62
3.2.2.- El cortex dorsal.....	63

3.3.- Aferencias a las áreas dorsomedial y dorsal.....	70
3.3.1.- El cortex medial.....	70
3.3.2.- El cortex dorsomedial.....	74
3.3.3.- El cortex lateral.....	76
3.3.4.- Estructuras del telencéfalo basal.....	79
3.3.5.- La proyección talámica.....	82
3.3.6.- Los cuerpos mamilares.....	85
3.3.7.- El núcleo del rafe.....	89
3.4.- Aferencias exclusivas al cortex dorsomedial.....	137
3.4.1.- El cortex dorsal.....	137
3.5.- Aferencias exclusivas al cortex dorsal.....	144
3.5.1.- El núcleo esférico.....	144
3.5.2.- El área triangularis.....	145
3.5.3.- Los núcleos olfativos anteriores.....	145
3.6.- Eferencias del cortex dorsomedial.....	151
3.6.1.- Salida de axones eferentes.....	151
3.6.2.- Eferencias sobre el cortex medial.....	152
3.6.3.- Eferencias sobre el cortex dorsal.....	155
3.6.4.- Eferencias sobre el septum.....	156
3.6.5.- Eferencias sobre el propio cortex dorsomedial.....	157
3.7.- Eferencias del cortex dorsal.....	167
3.7.1.- Eferencias de la subregión medial (D1)..	169
3.7.2.- Eferencias de la subregión intermedia (D2).....	171
3.7.3.- Eferencias de la subregión lateral (D3).	172

4.1.- De la técnica.....	200
4.1.1.- Condiciones de inyección.....	203
4.1.2.- Tiempo de supervivencia.....	204
4.1.3.- Revelado de HRP.....	205
4.2.- Aferencias a las áreas corticales dorsomedial y dorsal.....	207
4.2.1.- Aferencia desde el cortex medial.....	207
4.2.2.- Aferencia desde el cortex lateral.....	215
4.2.3.- La aferencia subcortical.....	218
4.2.4.- La aferencia talámica.....	221
4.2.5.- La aferencia hipotalámica.....	224
4.2.6.- La aferencia romboencefálica.....	227
4.3.- Aferencias exclusivas al cortex dorsal.....	230
4.3.1.- Aferencia desde los núcleos olfativos anteriores.....	230
4.3.2.- Aferencia desde el núcleo esférico.....	231
4.3.3.- Aferencia desde el área triangularis....	231
4.4.- Eferencias desde el cortex dorsomedial.....	233
4.4.1.- Eferencias sobre el cortex medial.....	234
4.4.2.- Eferencias sobre el cortex dorsal.....	236
4.4.3.- Eferencias sobre el cortex dorsomedial..	237
4.4.4.- Eferencias sobre septum.....	243
4.5.- Eferencias del cortex dorsal.....	245

4.5.1.- Generalidades.....	246
4.5.2.- Proyecciones de la subregión medial	
(D1).....	248
4.5.3.- Proyecciones de la subregión intermedia	
(D2).....	251
4.5.4.- Proyecciones de la subregión lateral	
(D3).....	254
4.5.4.1.- De la porción rostral.....	254
4.5.4.2.- De la porción caudal.....	256
4.6.- Consideraciones finales.....	258
CONCLUSIONES.....	261
BIBLIOGRAFIA.....	267

INTRODUCCION

1.1.- ESTRUCTURA GENERAL DEL TELENCEFALO DE REPTILES

1.2.- ORGANIZACION GENERAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE REPTILES

1.3.- CONEXIONES DE LA CORTEZA CEREBRAL DE REPTILES SQUAMATA

1.3.1.- CONEXIONES INTRACORTICALES

1.3.2.- EFERENCIAS EXTRACORTICALES

1.3.3.- AFERENCIAS EXTRACORTICALES

1.3.4.- COMPARACION CON OTROS ORDENES DE REPTILES

1.4.- EL SISTEMA TIMM POSITIVO DE REPTILES Y MAMIFEROS

1.5.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

1.1.- ESTRUCTURA GENERAL DEL TELENCEFALO DE REPTILES

El telencéfalo ocupa la porción más rostral del cerebro de reptiles y ha sido subdividido en dos partes: los hemisferios cerebrales que constituyen la porción anterior, par, hipertrofiada y evaginada; y el telencéfalo medio que forma una zona de tránsito entre telencéfalo y diencefalo.

Los hemisferios cerebrales se evaginan secundariamente y forman los bulbos olfativos principal y accesorio, aunque estos últimos no se encuentran presentes en los órdenes Quelonia y Crocodilia. Los bulbos olfativos se unen al resto del telencéfalo mediante los pedunculos olfativos.

El resto de los hemisferios cerebrales se puede subdividir en dos porciones: el palio que es dorsal respecto al ventrículo lateral; y el subpalio que es ventral respecto al mismo.

El palio o corteza cerebral constituye una lámina dorsal que se encuentra dividida en tres áreas dispuestas longitudinalmente: el cortex medial, el cortex dorsal y el cortex lateral. Adicionalmente, algunos autores consideran a la porción inmediatamente ventral respecto al ventrículo lateral, la cresta ventricular dorsal (DVR) como parte del palio en virtud de su origen embrionario (Northcutt, 1978), en este trabajo, en razón de su localización anatómica, se considerará como parte del subpalio.

La porción más rostral del subpallio esta ocupada por los núcleos olfativos anteriores, los cuales en ocasiones se encuentran presentes incluso en los pedunculos olfativos.

La parte medial del subpallio esta ocupada dorsalmente por los núcleos septales y ventralmente por el núcleo accumbens y el tubérculo olfativo que se continua caudalmente con los núcleos de la banda diagonal.

A su vez, la parte lateral del subpallio se puede subdividir en dos áreas: un área dorsal, la cresta ventricular dorsal (DVR) y un área ventral, el estriado. El DVR se puede subdividir en dos porciones una porción anterior (ADVR) y una porción basal (BDVR); esta última, a su vez se divide en el núcleo esférico y en una parte posterior (PDVR) que comprende varios núcleos que constituyen el complejo amigdalino. El estriado, por otra parte, se divide en una parte dorsal y una parte ventral.

El telencéfalo medio esta formado por los fascículos prosencefálicos lateral (LFB) y medial (MFB), el núcleo del lecho del MFB (bMFB), núcleo del lecho de la comisura anterior (bAC) y los núcleos preópticos que constituyen una zona de tránsito con el hipotálamo y para diversos autores es considerado como parte del mismo (Cruce, 1974).

Las distintas áreas y regiones del telencéfalo aparecen representadas en la Figura 1.1.

Clásicamente y atendiendo sobre todo a criterios de

conexiones, cada una de las mencionadas regiones del telencéfalo ha sido enmarcada dentro de alguno de los principales sistemas neuronales. La porción anterior de la cresta ventricular dorsal (ADVR) recibe proyecciones sensoriales talámicas, proyectando a su vez al estriado (Hoogland, 1977, 1981; Lohman y Van Woerden Verkley, 1978; Bruce y Butler, 1984b; Ulinski, 1984). Del mismo modo, también se ha registrado actividad visual en el espesamiento paleal (Andry & Northcutt, 1976), así como aferencias visuales talámicas (Bruce & Butler, 1984a). En base a estos datos, el ADVR y el espesamiento paleal han sido funcionalmente comparados al neopallio de mamíferos.

El sistema olfativo lo forman los bulbos olfativos principal y accesorio, los núcleos olfativos anteriores, el núcleo esférico y el cortex lateral, el cual ha sido comparado al cortex piriforme y/o entorrinal (Ulinski & Kanarek, 1973; Halpern & Silfen, 1974; Halpern, 1976, 1980; Ulinski & Peterson, 1981; Martínez García et al., 1986; Amiguet, 1986).

Por último, las áreas corticales medial y dorsal, así como el septum, han sido enmarcadas en un sistema de conexiones junto con los núcleos anteriores talámicos, el hipotálamo y el núcleo del rafe (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976, 1978; Hoogland et al., 1978; Butler, 1980; Lohman et al., 1983; Bruce & Butler, 1984a). Este eje cortico-septo-diencefalo-mesencefálico corresponde al concepto clásico de sistema límbico (Nauta &

Karten, 1970; Lohman et al., 1983).

Sobre las anteriores afirmaciones generales es necesario realizar algunas puntualizaciones. Dichas consideraciones son válidas para el orden Squamata. En Quelonia, en el cortex dorsal o general se ha podido registrar actividad eléctrica tras estimulación visual (Belekhova, 1979) y recibe proyecciones del núcleo geniculado lateral (Hall y Ebner, 1970; Hall et al., 1976; Quimet et al., 1985; Ulinski, 1986) lo cual confiere a esta región paleal cierto carácter neocortical.

1.2.- ORGANIZACION GENERAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE REPTILES

El palio o corteza cerebral de reptiles ha sido dividido topográfica y citoarquitectónicamente en tres áreas: cortex medial, cortex dorsal y cortex lateral. Adicionalmente, en el extremo latero-rostral del cortex dorsal se ha descrito una nueva zona de empaquetamiento celular laxo: el espesamiento paleal; y en el borde dorsal del cortex medial se puede diferenciar una nueva región cortical el cortex dorsomedial cuyos somas se disponen en continuidad con los del cortex medial aunque su tamaño es sensiblemente superior y su empaquetamiento más laxo. Las mencionadas regiones corticales han sido referidas de distintos modos a lo largo de los años basándose fundamentalmente en su homología topográfica con las

regiones corticales de mamíferos. Dichas nomenclaturas se resumen en el cuadro I.

En el presente trabajo se va a utilizar la nomenclatura topográfica propuesta por Ebbesson y Uoneida (1969) en Tupinambis nigropunctatus. Según dicha nomenclatura la corteza cerebral se divide en 4 áreas que en sentido medio-lateral son: el cortex medial, el cortex dorsomedial, el cortex dorsal y el cortex lateral. En el cortex dorsal se pueden definir tres subregiones: medial o D1 con empaquetamiento celular laxo, intermedia o D2 con los somas dispuestos en un único estrato granular compacto y la subregión lateral o D3 la cual presenta nuevamente empaquetamiento celular laxo. El cortex lateral también presenta una clara división en dos subregiones atendiendo, también al empaquetamiento neuronal: la subregión dorsal o L1 con los cuerpos neuronales mas o menos dispersos y la subregión ventral o L2 con los somas dispuestos en glomérulos. Posteriormente también ha sido subdividido el cortex medial en tres porciones: M1-1 en la cual el estrato de somas se incurva ventralmente, M1-2 en la cual el estrato de somas es paralelo al sulcus interhemisférico y M1-3 en la cual el estrato de somas se incurva dorsalmente (Beckers et al., 1971/1972).

En todas las regiones corticales se puede observar un patrón de laminación claro. Dicha laminación permite distinguir los siguientes estratos o capas desde la membrana glial hasta el epéndimo: membrana glial limitante

superficial, capa plexiforme externa, estrato de somas, capa plexiforme interna, alveus y epéndimo. Este patrón sufre algunas modificaciones en determinados puntos, de tal modo que en los extremos medial y lateral del cortex dorsal el estrato de somas se dispone por debajo de los estratos granulares de las áreas dorsomedial y lateral respectivamente, en estos casos se define una capa plexiforme intermedia entre los estratos de somas y a estas regiones se las denomina superpositio medialis y superpositio lateralis (Lange, 1911). También en el cortex dorsal y en su capa plexiforme interna, a niveles caudales, se ha observado la presencia de agrupaciones neuronales en glomerulos inmediatamente por encima del epéndimo dicha formación ha sido denominada "cell plate" (Unger, 1906, Butler, 1980).

Por otra parte, en el cortex lateral los somas neuronales no se disponen en un estrato único por lo que en ocasiones resulta dificultoso definir las capas plexiformes.

En la figura 1.2 se representan, en sección transversal las distintas regiones, subregiones y capas de la corteza cerebral junto con la nomenclatura utilizada en el presente trabajo.

1.3.- CONEXIONES DE LA CORTEZA CEREBRAL DE REPTILES SQUAMATA

Generalmente se ha considerado que las distintas regiones de la corteza cerebral de reptiles presentan una organizacion más simple que las correspondientes homólogas en el telencéfalo de mamíferos. A pesar de ello, la información bibliográfica acerca del modelo de conexiones de las distintas áreas paleales en reptiles es mucho más fragmentaria y en ocasiones contradictoria que la disponible en las correspondientes áreas de mamíferos. Este hecho determina que la comparación entre ellas sea en muchos casos intuitiva y/o incompleta.

Dos son las razones que determinan la escasez de información acerca de las proyecciones de la corteza cerebral de reptiles Squamata:

- El escaso número de especies estudiadas, siempre pertenecientes a familias distintas. En este sentido, tan sólo han sido analizadas las proyecciones corticales de Tupinambis (Voneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976, 1978) Gekko (Butler, 1976; Bruce & Butler, 1984a) e Iguana (Bruce & Butler, 1984a) dentro del suborden Lacertilia y Natrix, Thamnophis (Ulinski, 1975, 1976) y Vipera (Reperant, 1976) dentro del suborden ofidia.

-La escasa variedad de técnicas con las que se ha abordado el trazado de conexiones corticales en reptiles. A

este respecto, unicamente se ha utilizado la técnica de transporte retrógrado de peroxidasa de rábano (HRP) en tres ocasiones (Reperant, 1976; Lohman y Van Woerden Verkley, 1978; Bruce y Butler, 1984a). En el resto de los casos el problema ha sido abordado mediante técnicas de lesión seguida de impregnación argéntica selectiva de terminales anterógradamente degenerados.

Según los datos bibliográficos el modelo de conexiones de las áreas corticales medial, dorsomedial y dorsal se asemeja, con alguna reserva, al que presenta la formación hipocámpica de mamíferos (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976, 1978; Ulinski, 1976; Lohman et al., 1983), mientras que el cortex lateral de reptiles parece corresponder al cortex entorrinal y/o piriforme de mamíferos (Gamble, 1952; Halpern, 1976; Ulinski & Peterson, 1981; Martínez García et al., 1986).

Las conexiones de la corteza cerebral de reptiles Squamata se presentan a dos niveles: intracorticales y extracorticales, y con fines puramente expositivos estas últimas se van a dividir en aferencias y eferencias del sistema cortical.

1.3.1.- CONEXIONES INTRACORTICALES

El cortex medial recibe proyecciones bilaterales desde el cortex dorsomedial, e ipsilateralmente desde el cortex dorsal y el cortex lateral. Estas proyecciones se

presentan de un modo laminar sobre la capa plexiforme externa, de tal modo que el cortex lateral proyecta sobre el tercio distal, el cortex dorsal sobre el tercio intermedio y el cortex dorsomedial sobre el tercio interno asi como sobre la capa plexiforme interna (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1976; Bruce y Butler, 1984a; Martinez Garcia et al., 1986). Por otra parte, el cortex medial da lugar a eferencias homolaterales sobre el cortex dorsal y el cortex dorsomedial en una proyección masiva que abarca de la mitad a los 2/3 proximales al estrato de somas de las capas plexiformes externas y las capas plexiformes internas (Lohman y Mentink, 1972; Lohman y Van Woerden Verkley, 1976, Ulinski, 1976), también han sido descritas una proyección sobre el cortex lateral y sobre la porcion laterodorsal de la cresta ventricular dorsal (Lohman & Mentink, 1972).

El cortex dorsomedial recibe proyecciones intracorticales fundamentalmente desde el cortex medial y del cortex dorsomedial contralateral (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1976; Butler, 1976). También ha sido descrita una proyección desde el cortex dorsal (Bruce & Butler, 1984a; Olucha et al., 1985b). Por otra parte, todas las eferencias del cortex dorsomedial son bilaterales y terminan en el cortex medial, y en el propio cortex dorsomedial (Voneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van

Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1976); adicionalmente se han descrito eferencias sobre el cortex dorsal (Bruce & Butler, 1984a; Olucha et al., 1985b) y sobre la porción dorsal del cortex lateral (Butler, 1976).

Las aferencias intracorticales del cortex dorsal proceden del cortex medial (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1976) y del cortex dorsomedial (Bruce y Butler, 1984a; Olucha et al., 1985). A su vez, el cortex dorsal proyecta sobre el cortex medial (Uoneda & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976) sobre el cortex dorsomedial (Bruce & Butler, 1984a; Olucha et al., 1985) y sobre el cortex lateral (Lohman & Mentink, 1972; Amiguët, 1986).

El cortex lateral recibe proyecciones del cortex medial y del cortex dorsal (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976) y a su vez proyecta al cortex medial (Ulinski, 1976; Martínez García et al., 1986) y al cortex lateral contralateral (Halpern, 1976; Martínez García et al., 1986).

Las distintas proyecciones intracorticales han sido representadas en la Figura 1.3.

1.3.2.- EFERENCIAS EXTRACORTICALES

Las proyecciones eferentes de la corteza cerebral de reptiles Squamata han sido estudiadas fundamentalmente mediante técnicas de degeneración. Dichos estudios señalan

claramente la existencia de dos grupos de eferencias extracorticales: las del cortex medial y cortex dorsal sobre septum e hipotálamo y las del cortex lateral que por su parte son claramente olfativas. La única eferencia descrita del cortex dorsomedial lo ha sido mediante el método de Golgi observandose axones de las células bipiramidales que se adentran en la porción dorsal del septum (Ramón y Cajal, 1917).

El cortex medial proyecta bilateralmente al septum dorsal precomisural (Lohman & Mentink, 1972; Ulinski, 1975; Lohman & Van Woerden Verkey; 1976) y sobre el núcleo periventricular del hipotálamo y porción laterodorsal de la cresta ventricular dorsal anterior (ADUR) (Lohman & Mentink, 1972).

El cortex dorsal presenta varios grupos de eferencias cuyos somas neuronales de origen se localizan en distintas áreas de esta región cortical; sin embargo, parece ser que todo el cortex dorsal proyecta sobre el septum dorsal a niveles postcomisurales y sobre el septum ventral a niveles comisurales y precomisurales (Ulinski, 1975). Las neuronas localizadas a niveles rostrales proyectan a través del fornix postcomisural al núcleo periventricular del hipotálamo y las situadas a niveles caudales lo hacen a través del fornix precomisural al núcleo preóptico del hipotálamo. Por último, la porción lateral del cortex dorsal proyecta al núcleo amigdalino externo (PDUR) y núcleo accumbens (Lohman & Van Woerden

Verkley, 1976).

Las eferencias extracorticales del cortex lateral, si las hay son fundamentalmente olfativas. Se ha señalado la posibilidad de una proyección sobre el estrato granular del bulbo olfativo principal y sobre la porción externa de la rama horizontal del núcleo de la banda diagonal (Amiguet, 1986).

Las distintas eferencias extracorticales han sido resumidas en la figura 1.4.

1.3.3.- AFERENCIAS EXTRACORTICALES

El estudio de las aferencias extracorticales a la corteza cerebral de reptiles del orden Squamata sólomente ha sido posible tras el desarrollo de técnicas de trazado de conexiones mediante el transporte retrógrado de marcadores tales como peroxidasa de rábano (HRP).

En Vipera aspis (Reperant, 1976) se ha descrito una aferencia desde la porción dorsal del septum sobre el cortex dorsal. Dicha proyección también ha sido observada en Tupinambis (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978). Sin embargo, posteriormente se ha señalado la posibilidad de que la presencia de cuerpos neuronales retrógradamente marcados en la región septal se deba a errores técnicos (Hoogland et al., 1979).

En Tupinambis se señala la existencia de tres proyecciones extratelencefálicas sobre las áreas corticales

medial, dorsomedial y dorsal: el núcleo dorsolateral anterior (NDLA) del tálamo, los cuerpos mamilares y el núcleo del rafe superior. El NDLA proyecta al cortex medial y al cortex dorsal, mientras que el cortex dorsomedial recibe las aferencias de los cuerpos mamilares y del núcleo del rafe superior (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978).

En un estudio más reciente realizado en Gekko e Iguana, se ha observado que todas las áreas corticales reciben aferencias tanto de los cuerpos mamilares como del NDLA, adicionalmente se ha señalado que este último núcleo esta dividido en dos porciones: la pars magnocellularis y la pars parvocellularis, las cuales dan lugar a distintas proyecciones sobre las diferentes regiones corticales (Bruce & Butler, 1984a). Sin embargo, en Podarcis no se han observado aferencias al cortex lateral ni desde el NDLA ni desde los cuerpos mamilares (Martínez García et al., 1986).

También en Gekko e Iguana se ha observado que el núcleo del rafe superior proyecta sobre el cortex medial, cortex dorsomedial y cortex dorsal. Mientras que el locus coeruleus, tegmentum ventral y núcleo parvicelular medial, dan origen a sendas proyecciones sobre el cortex dorsal, el cual también recibe aferencias del núcleo basal del telencéfalo, núcleo de la banda diagonal y núcleo del lecho de la comisura anterior. Mientras que el cortex medial y el cortex dorsomedial son receptoras de proyecciones procedentes del núcleo preóptico del

hipotálamo (Bruce & Butler, 1984a).

Todas las aferencias descritas anteriormente se refieren fundamentalmente a las áreas paleales medial, dorsomedial y dorsal. El cortex lateral, por otra parte esta envuelto en un sistema de proyecciones distinto que presentan un caracter olfativo. De tal modo que la mayor aferencia a esta región cortical tiene su origen en el bulbo olfativo principal (Heimer, 1969; Halpern, 1975; Ulinski & Peterson, 1981; Martínez García et al., 1986). También se han descrito aferencias al cortex lateral desde el núcleo del tracto olfatorio lateral, núcleo amigdalino ventral y rama horizontal del núcleo de la banda diagonal (Martínez García et al., 1986; Amiguet, 1986).

Las distintas aferencias extracorticales de la corteza cerebral han sido resumidas en la figura 1.5.

1.3.4.- COMPARACION CON OTROS GRUPOS DE REPTILES

La organización de la corteza cerebral en los distintos ordenes de reptiles difiere notablemente tanto en lo referente a su citoarquitectura como al sistema de proyecciones que presentan. Respecto a los aspectos citoarquitectónicos ya se ha señalado anteriormente que, a diferencia de los reptiles Squamata, tanto Quelonia como Cocodrilia no presentan un cortex dorsomedial diferenciado como tal, al mismo tiempo en estos grupos no existe una delimitación clara entre las tres áreas corticales (medial,

dorsal y lateral), en las cuales los somas neuronales se disponen periventricularmente.

Debido precisamente a la difícil delimitación citoarquitectónica de las áreas corticales su modelo de conexiones intrínsecas no ha sido abordado tanto en Quelonia como en Cocodrilia. Por el contrario si se han estudiado en tortugas las aferencias a la corteza cerebral, fundamentalmente al cortex dorsal o general. Según estos datos dicha región recibe proyecciones aferentes fundamentalmente del núcleo geniculado lateral (Hall y Ebner, 1970; Ouimet et al., 1984). Este dato concuerda con los resultados electrofisiológicos según los cuales el cortex dorsal procesa información visual (Belakhova, 1979). Adicionalmente también se han observado aferencias desde los núcleos anteriores talámicos, núcleo del rafe y núcleos del telencéfalo basal (Ouimet et al., 1984)

1.4.- EL SISTEMA TIMM POSITIVO DE REPTILES Y MAMIFEROS

El método de Timm (Timm, 1958; Danscher & Zimmer, 1978; Danscher, 1981) permite demostrar la presencia de metales pesados, fundamentalmente Zinc, en cortes histológicos. Dicha técnica ha sido ampliamente utilizada para la descripción anatómica de regiones cerebrales ricas en Zinc (Molowny, 1980; López García et al., 1983).

En la corteza cerebral y septum de reptiles Squamata se han descrito una serie de áreas que muestran

una marcada reacción positiva cuando se aplica el mencionado método de Timm. Dicho marcaje comprende el tercio intermedio de la capa plexiforme interna del cortex medial, los 2/3 proximales al estrato de somas de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial y su capa plexiforme interna excepto alveus, la mitad proximal al estrato de somas del cortex dorsal y su capa plexiforme interna excepto alveus y por último la porción dorsal del septum, excepto una estrecha banda en las porciones mas dorsales a nivel comisural y postcomisural (fig. 1.6) (Ketelslegers, 1969; Molowny & López García, 1978; López García et al., 1983a).

La presencia de la reacción de Timm en estas zonas ha sido correlacionada con el contenido en Zinc en las mismas (Molowny, 1980). Estas mismas zonas corresponden a las zonas de proyección del cortex medial (Lohman & Mentink, 1972; Ulinski, 1975, 1976; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Poch et al., 1985).

Cuando se analizan las mencionadas áreas Timm positivas corticales y septales en microscopía electrónica se ha observado que dicha reacción es debida a la presencia del producto de la reacción en el interior de las vesículas sinápticas de un tipo particular de terminales axónicos. Este hecho es particularmente evidente cuando se aplica una modificación especial del método de Timm para microscopía electrónica: el método sulfhídrico-osmio (López García et al., 1983b, 1984). Los terminales axónicos Timm positivos

dan lugar a contactos sinápticos asimétricos sobre las espinas de las dendritas apicales y basales de las neuronas bipiramidales de las áreas dorsomedial y dorsal, sobre las neuronas de la capa plexiforme interna del cortex medial y sobre las neuronas septales (Soriano, 1980; Molowny, 1980; Martínez Guijarro et al., 1984).

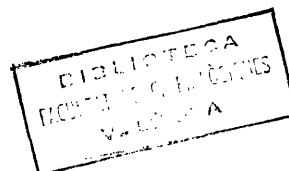
En mamíferos, el método de Timm ha permitido definir el sistema de proyección de las fibras musgosas del hipocampo, las cuales aparecen intensamente marcadas. Este sistema de proyecciones abarca el campo CA4 y el stratum lucidum del campo CA3 del asta de Ammon (Timm, 1958; Haug, 1974; Zimmer y Haug, 1978). Los análisis efectuados en microscopía electrónica muestran que estas regiones están ocupadas por los contactos sinápticos de las fibras musgosas, las cuales dan lugar a terminales axónicos grandes que forman sinapsis de paso sobre las espinas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 y sobre las dendritas apicales y basales de las neuronas de CA4, los contactos sinápticos son asimétricos con vesículas esféricas en el interior de las cuales se localiza el precipitado de plata cuando se aplica el método de Timm en microscopía electrónica (Blakstad & Kjaerheim, 1961; Laastch & Cowan, 1966; Haug, 1967; Perez Clausell & Danscher, 1985).

El sistema de fibras musgosas del hipocampo y su proyección sobre CA3 y CA4 está organizada topográficamente aproximadamente sobre su mismo nivel según el eje

rostro-caudal, de tal modo que practicamente no existe solapamiento en la proyección de las neuronas granulares de regiones adyacentes según este mismo eje (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blakstad et al., 1970; Amaral, 1978; Swanson et al., 1978).

La existencia de un sistema de proyecciones histoquímicamente comparables, en base a su contenido en Zinc, ha permitido homologar a las áreas corticales medial, dorsomedial y dorsal de reptiles Squamata con la formación hipocámpica de mamíferos, de tal modo que el cortex medial correspondería a la fascia dentada y los cortex dorsomedial y dorsal al asta de Ammon (Molowny & López García, 1978).

Sin embargo, la proyección Timm positiva es únicamente una de las que tienen lugar tanto en la formación hipocámpica como en la corteza cerebral de reptiles y para el establecimiento de homologías entre ambos sistemas es necesaria la comparación de las conexiones globales de ambos modelos de organización.



1.5.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

A pesar de la extensión con la cual han sido estudiadas las conexiones de la corteza cerebral de reptiles Squamata, dicho estudio se puede considerar incompleto, aún actualmente, debido a dos aspectos: en primer lugar, este problema ha sido abordado casi exclusivamente mediante técnicas de degeneración, aunque en algunos casos se hayan utilizado técnicas de Golgi y de transporte retrógrado de HRP; y en segundo lugar, el estudio no ha sido exhaustivo por cuanto en muchas ocasiones no se ha prestado atención a la topografía de las proyecciones o a las distintas proyecciones que pudieran presentar las distintas subregiones de un área cortical como por ejemplo el cortex dorsal.

En el presente trabajo se pretende establecer el modelo de conexiones de las áreas corticales dorsomedial y dorsal mediante técnicas de transporte anterógrado y retrógrado de HRP. Comprobando, en la medida de lo posible, las aferencias definidas mediante transporte retrógrado con las eferencias observadas con transporte anterógrado y considerando asimismo la topografía de las proyecciones observadas.

Se han escogido para su estudio las áreas corticales dorsomedial y dorsal ya que son receptoras de un sistema de proyecciones Timm positivo similar al sistema de proyecciones de las fibras musgosas, por lo que se puede

establecer "a priori" una comparación entre estas áreas corticales y las regiones receptoras de las fibras musgosas en el asta de Ammon del hipocampo de mamíferos.

En el establecimiento del modelo de conexiones se prestará especial atención en primer lugar al origen del sistema Timm positivo con objeto de comparar dicha región con la fascia dentada; y en segundo lugar, las proyecciones exclusivas de cada subregión permitirán comparar a las mismas con las distintas subregiones del asta de Ammon.

Fig. 1.1.- Estructura general del telencéfalo de reptiles Squamata en visión dorsal (a) y en cortes transversales (b-g).

Abreviaturas: ACC, núcleo accumbens; ADVR, porción anterior de la cresta ventricular dorsal; BDh, porción horizontal del núcleo de la banda diagonal; BD, l núcleo de la banda diagonal; BDVR, porción basal de la cresta ventricular dorsal; bMFB, núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial; BOA, bulbo olfativo accesorio; BOP, bulbo olfativo principal; ca, comisura anterior; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CE, cerebelo; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; cpa, comisura paleal anterior; EST, estriado; lfb, fascículo prosencefálico lateral; mfb, fascículo prosencefálico medial; NE, núcleo esférico; NOA, núcleos olfativos anteriores; sm, estria medullaris; SP, septum; st: a terminalis; TO, tubérculo olfativo; TOP, techos ópticos

FIGURA 1.1

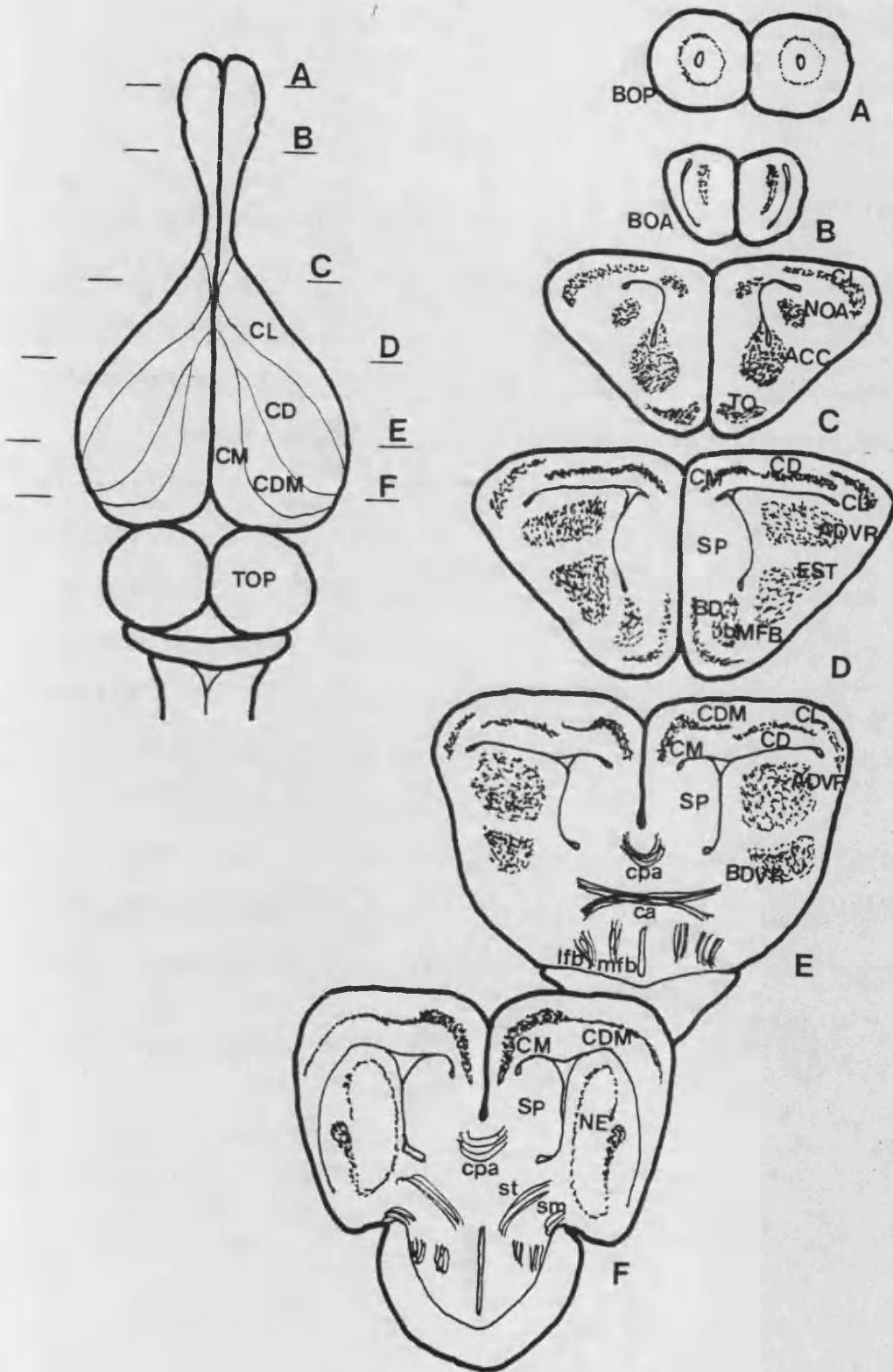


Fig. 1.2.- Estructura y divisiones de la corteza cerebral de Gallotia stehlini en una sección transversal a un nivel medio.

Abreviaturas: alv, alveus; bMFB, núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial; CD, cortex dorsal; D1, subregión medial del cortex dorsal; D2, subregión intermedia del cortex dorsal; D3 subregión lateral; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; L1, subregión dorsal del cortex lateral; L2, subregión ventral del cortex lateral; CM, cortex medial; DB, núcleo de la banda diagonal; DVR, cresta ventricular dorsal; EP, engrosamiento paleal; es, estrato de somas de las correspondientes áreas corticales; EST, estriado; pe, capa plexiforme externa de las correspondientes áreas corticales; pi, capa plexiforme interna de las correspondientes áreas corticales; pim, capa plexiforme intermedia; SP, septum

FIGURA 1.2

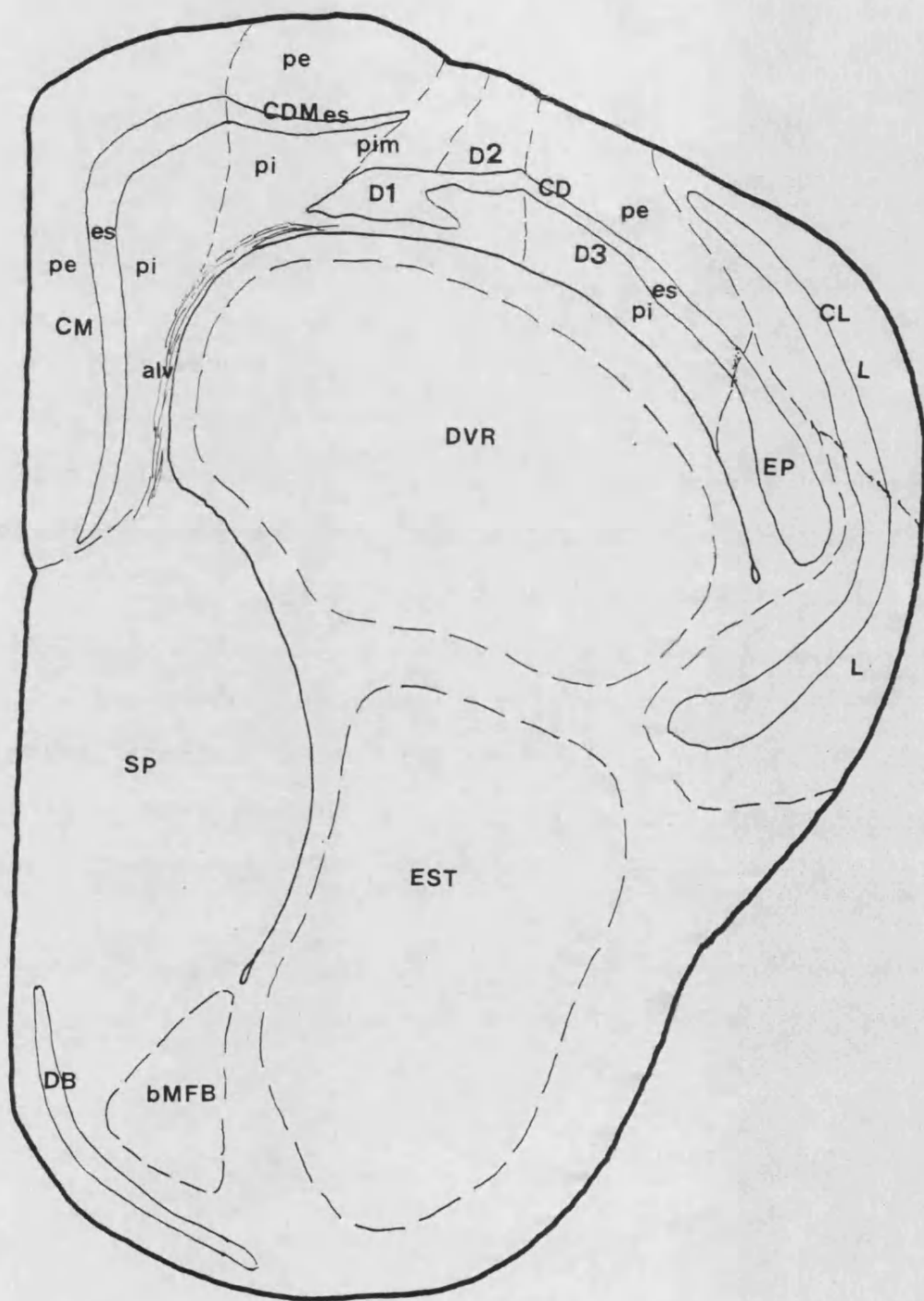


Fig. 1.3.- Esquema de conexiones intracorticales en reptiles Squamata. En el hemisferio derecho se han representado las eferencias del cortex dorsal y del cortex lateral y en el hemisferio izquierdo se han representado las del cortex dorsomedial y cortex medial.

Abreviaturas: ca, comisura anterior; CD, cortex dorsal, CDM, cortex dorsomedial, ch, comisura habenular; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; cpa, comisura paleal anterior; DUR, cresta ventricular dorsal; sm, stria medullaris; SP, septum.

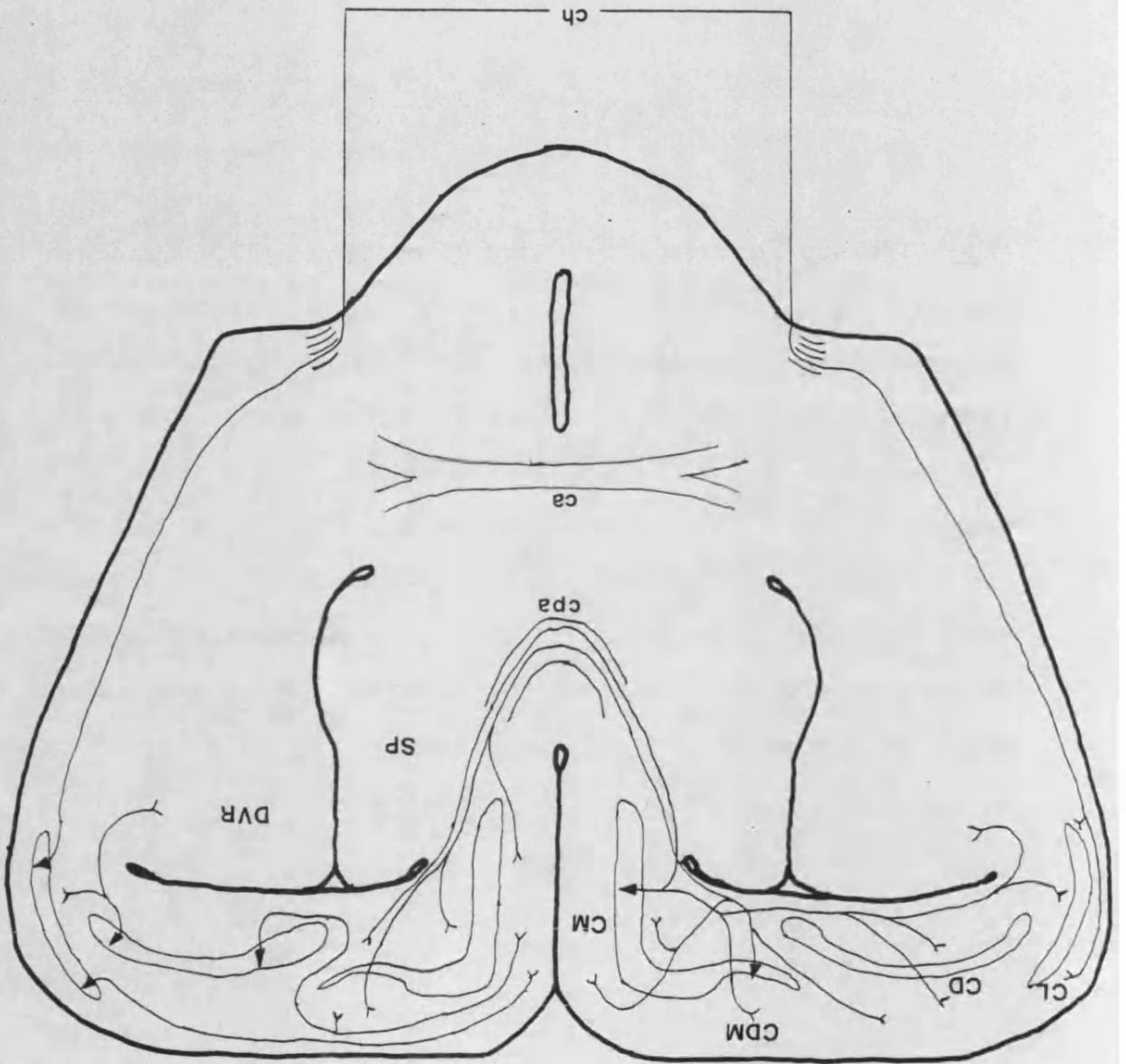


FIGURA 1.3

Fig. 1.4.- Esquema de las eferencias extracorticales de la corteza cerebral. En el hemisferio derecho se han representado las que tienen su origen en el cortex medial y en el cortex dorsomedial y en el izquierdo las del cortex dorsal.

Abreviaturas: ACC, núcleo accumbens, ALH, área lateral hipotalámica; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; cpa, comisura paleal anterior; DUR, cresta ventricular dorsal; fxpo, fornix postcomisural; fxpr, fornix precomisural; PUK, núcleo periventricular del hipotálamo; SPd, septum dorsal; SPv, septum ventral

FIGURA 1.4

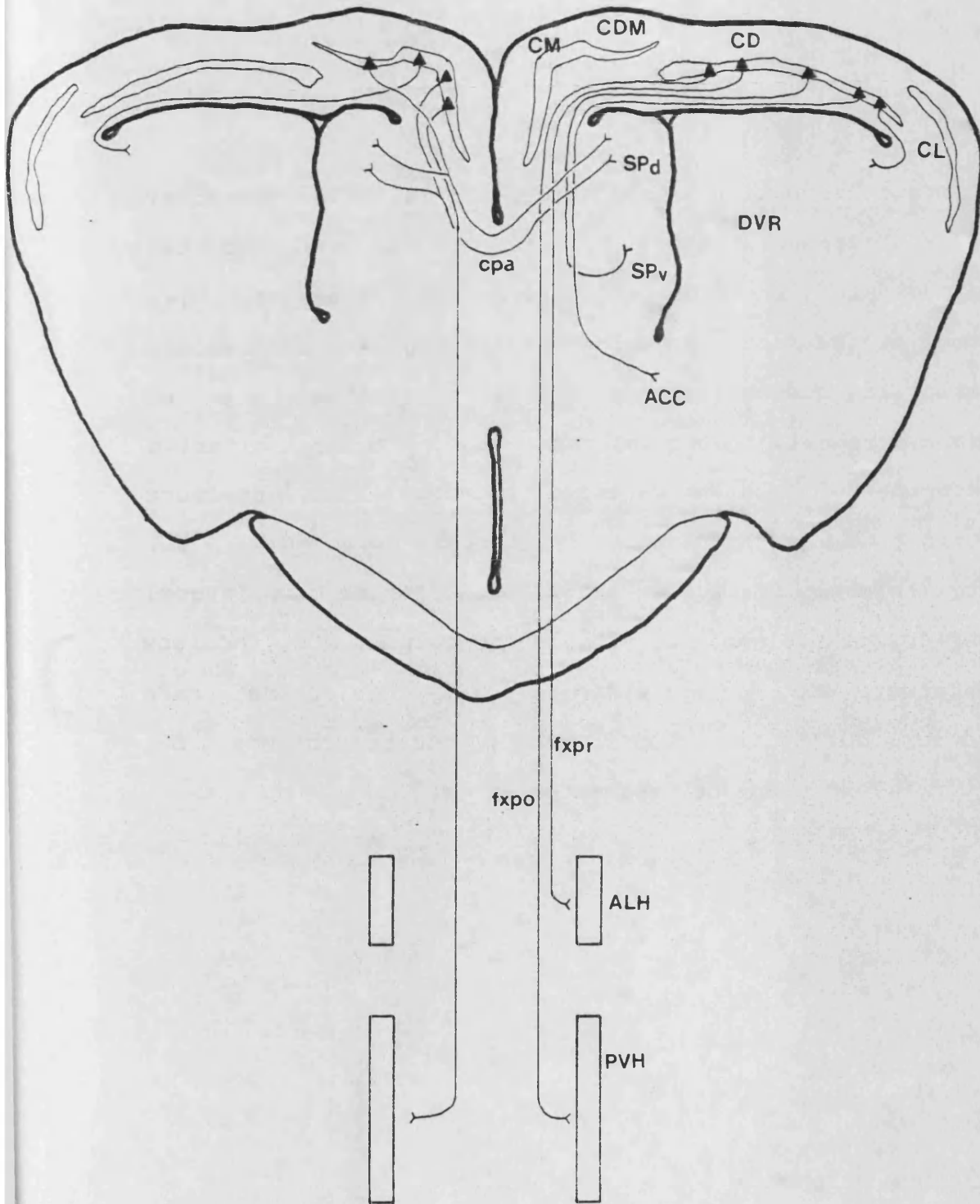


Fig. 1.5.- Aferencias extracorticales a la corteza cerebral de reptiles Squamata representadas en cortes longitudinales. En el esquema superior se representan las aferencias talámicas y telencefálicas y en el esquema inferior las que se originan en el hipotálamo y en el tronco cerebral. Abreviaturas: BOA, bulbo olfativo accesorio; BOP, bulbo olfativo principal; ca, comisura anterior; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; DLA, núcleo dorsolateral anterior del tálamo; LC, locus coeruleus; MB, núcleos mamilares; NE, núcleo esférico; NRS, núcleo del rafe superior; QO, quiasma óptico; RO, núcleo rotundo; SP, septum; UT, núcleos del tegmentum ventral.

FIGURA 1.5

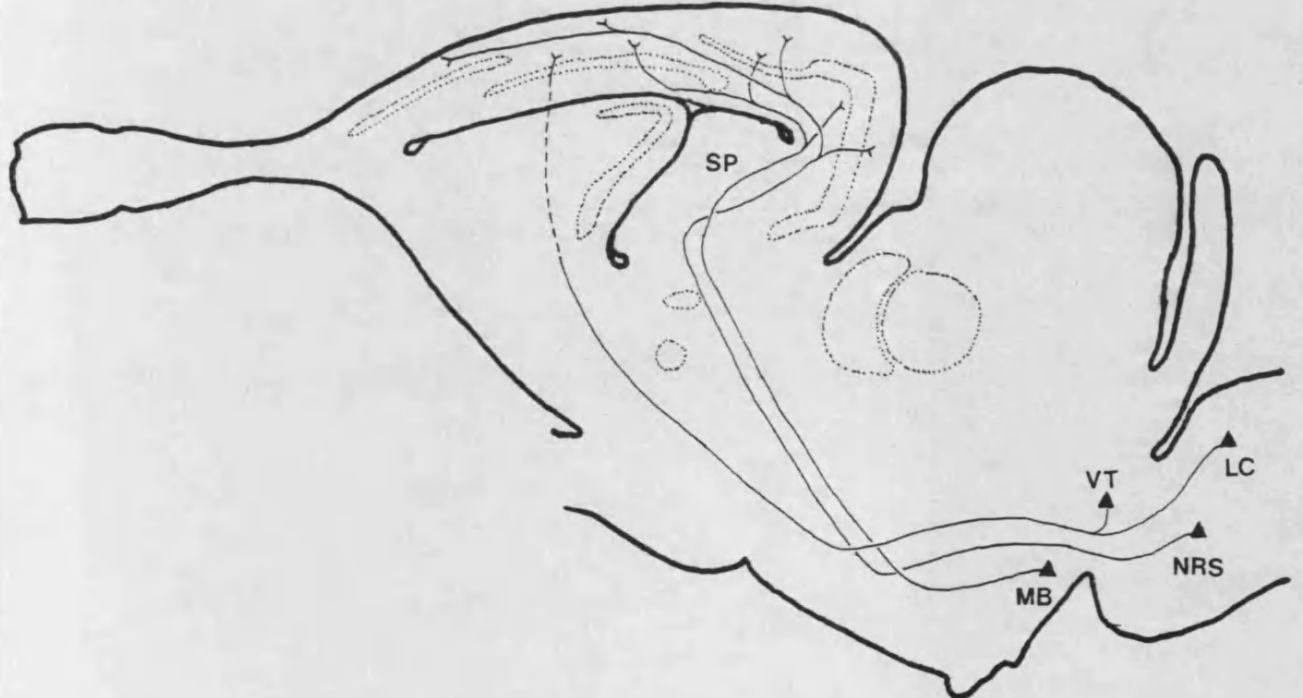
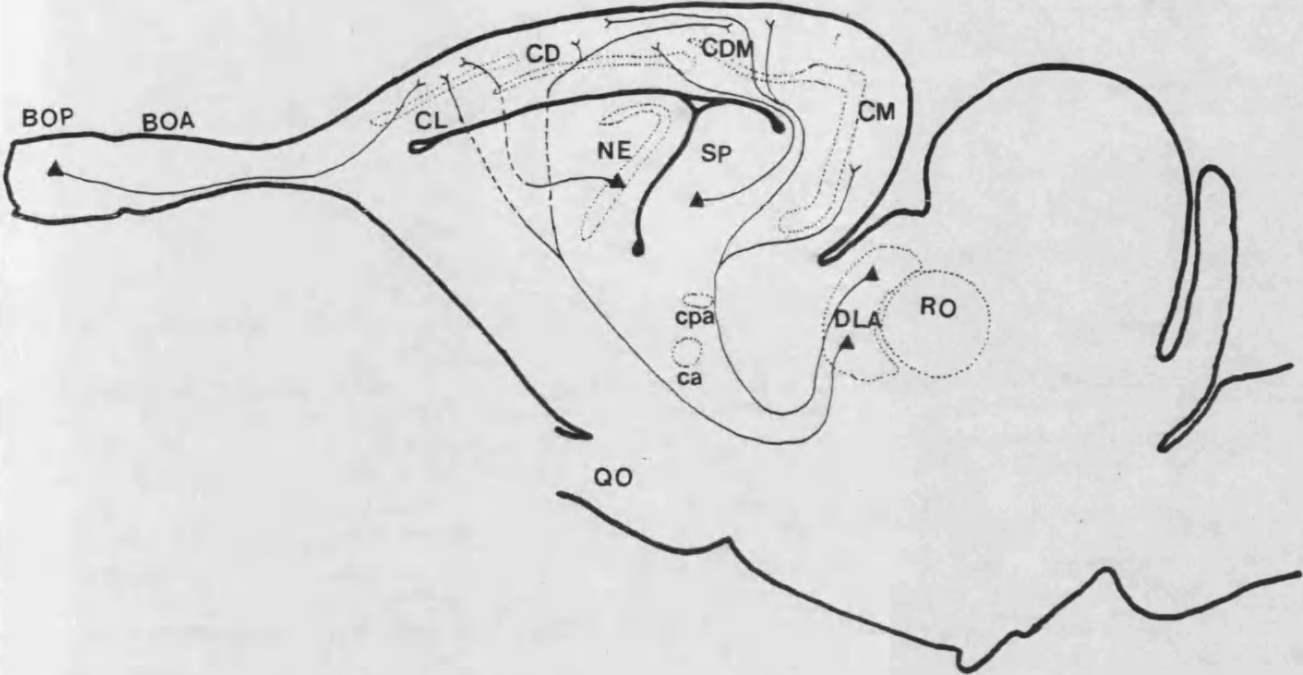
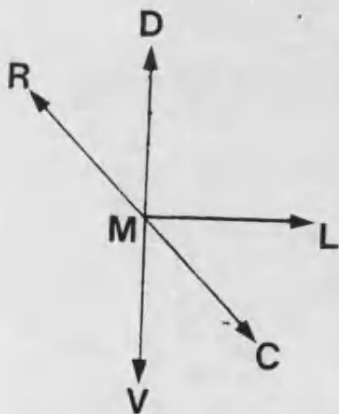
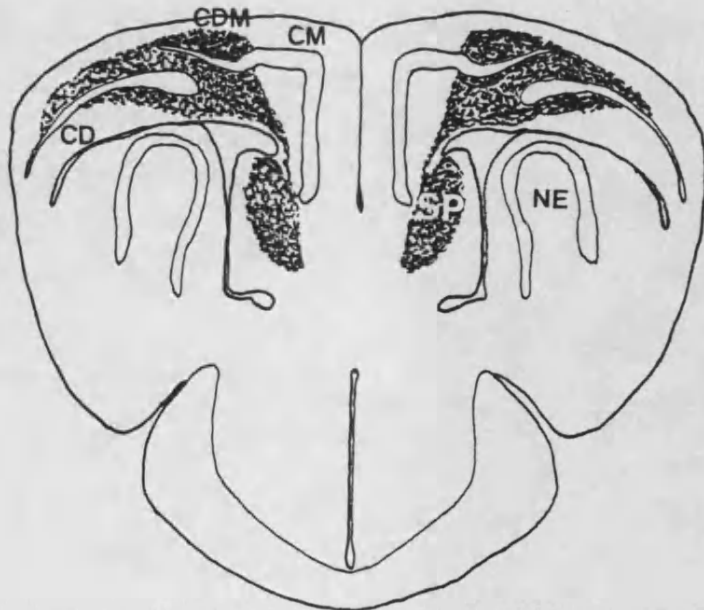
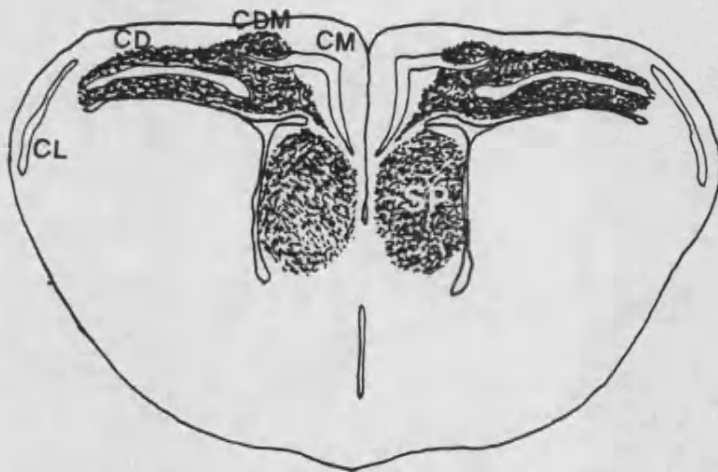
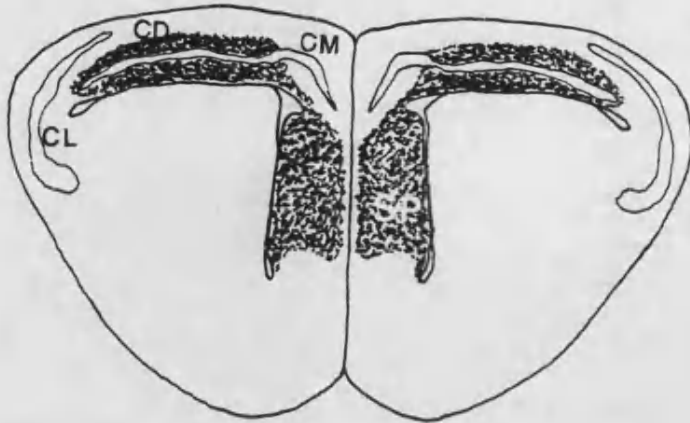


Fig. 1.6.- Areas Timm positivas en la corteza cerebral y septum de Podarcis hispanica. En el esquema se representan tres secciones transversales a un nivel anterior, medio y posterior. Como se puede observar el marcaje abarca fundamentalmente las áreas corticales dorsomedial y dorsal y el septum dorsal. En el esquema se han omitido las regiones con un marcaje de Timm debil.

Abreviaturas: ; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; DUR, cresta ventricular dorsal; NE, núcleo esférico; SP, septum

Ejes de referencia: D, dorsal; V, ventral; R, rostral, C, caudal; L, lateral; M, medial

FIGURA 1.6



AUTORES EJEMPLARES	CORTEX MEDIAL	CORTEX DORSOMEDIAL	CORTEX DORSAL	ENGROSAMIENTO PALEAL	CORTEX LATERAL	
Unger (1906) Gekko	Lámina celular células pequeñas	mediodorsal células grandes	Lámina celular dorsal y Lámina celular ventral		Lámina celular lateral	
Johnston (1915) Cistudo	Formación hipocámpica	Subiculum cornu ammonis	Pallium general		Lóbulo piriforme	
Crosby (1917) Alligator		Hipocampo pars dorsomedialis pars dorsalis	Cortex general		Cortex piriforme	
Rose (1923) Alligator	Subcampo I	FORMATIO Subcampo II	AMMONIS Subcampo III	Subcampo IV	Area prepiriforme Area 51	
Cairney (1926) Sphenodon		Hipocampo	Cortex general		Cortex piriforme	
Curwen (1937) Tupinambis		Fascia dentada	Formación ammonica	Cortex general	Engrosamiento paleal	Cortex piriforme Subr.L1 Subr.L2
Schepers (1948) Testudo		Hipocampo pars fascialis	pars magnocellulare	Pallium secundum parahipocámpico	Pallium secundum lateral	Complejo piriforme
Goldby y Gamble (1957) Todos los reptiles	Corteza hipocámpica células pequeñas	células grandes	Cortex dorsal	Engrosamiento paleal	Cortex piriforme	
Northcutt (1967) Iguana		Hipocampo pars dorsomedialis pars dorsalis	Cortex dorsomedialis	Cortex dorsolateral	Cortex piriforme	
Ebbesson y Voneida (1969) Tupinambis	Cortex medial	Cortex dorsomedial y Cortex ventral	Cortex dorsal Subr.D1 Subr.D2 Subr.D3	Engrosamiento paleal	Cortex lateral Subr.L1 Subr.L2	
Lohman y Mentink (1972) Tupinambis	Cortex mediodorsal células pequeñas	células grandes	Cortex dorsal Subr.D1 Subr.D2 Subr.D3	Engrosamiento paleal	Cortex lateral	
Ulinski (1974) Thamnophis Natrix	Cortex medial	Cortex dorsomedial	Cortex dorsal y "Ventral cell plate"		Cortex lateral Subr.L1 Subr.L2	

MATERIAL Y METODOS

2.1.- EJEMPLARES DE EXPERIMENTACION

2.2.- INYECCION ESTEREOTAXICA DE HRP

2.2.1.- EL APARATO DE ESTEREOTAXIA

2.2.2.- PREPARACION Y LLENADO DE MICRO- PIPETAS

2.2.3.- LA SOLUCION DE HRP

2.2.4.- LA INTERVENCION QUIRURGICA

- 1) Preparación del campo de inyección
- 2) Implantación de la micropipeta
- 3) Sellado de la herida
- 4) Tiempo de supervivencia

2.3.- FIJACION

2.3.1.- SOLUCIONES UTILIZADAS

2.3.2.- PERFUSION

2.3.3.- EXTRACCION DEL CEREBRO

2.3.4.- POSTFIJACION Y LAVADO

2.4.- EL REVELADO DE LA HRP

2.4.1.- MICROTOMIA DE CONGELACION

2.4.2.- REACCION HISTOQUIMICA

- 1) El método de DAB
- 2) El método de IMB-NPS
- 3) El método de IMB-HMA

2.4.3.- MONTAJE DE LAS SERIES Y TINCION DE CONTRASTE

2.5.- ESTUDIO DE LAS SERIES

El proceso experimental seguido se compone básicamente de cuatro pasos: a) inyección estereotáxica de la peroxidasa de rábano (HRP), b) tras el tiempo de supervivencia adecuado sacrificio de los animales mediante perfusión cardiaca seguida de extracción y fijación de los cerebros por inmersión, c) obtención de secciones del encéfalo, detección histoquímica de la HRP y montaje de las series histológicas y d) estudio de las mismas.

2.1.- EJEMPLARES DE EXPERIMENTACION

Durante el proceso experimental se utilizaron un total de 37 ejemplares de los cuales 6 fueron de Gallotia stehlinii capturados en Las Palmas de Gran Canaria y los 21 restantes de Podarcis hispanica capturados en Burjassot (Valencia). Los animales fueron mantenidos en cautividad en terrarios preparados al efecto hasta el momento de la operación y durante el periodo postoperatorio y alimentados con una dieta a base de Drosophila melanogaster y larvas de Tenebrio monitor.

2.2.- INYECCION ESTEREOTAXICA DE HRP

2.2.1.- EL APARATO ESTEREOTAXICO

Con objeto de efectuar una inyección precisa del enzima, se diseñó un aparato de estereotaxia que permitiera

la fijación del animal y al mismo tiempo fuera soporte del sistema de inyección y micromanipulación.

El equipo de estereotaxia se montó sobre una mesa a la cual se añadieron 250 kgr de peso y que asentaba sobre 4 cámaras de aire comprimido. De tal modo se logró aislar en gran medida la mesa de operaciones de las vibraciones del suelo.

El aparato de estereotaxia se monto sobre una tabla de fresar AEG mod. 347 que permite un movimiento controlado en dos direcciones perpendiculares de la placa base con una precisión de 50 #m. La placa base presenta tres ranuras paralelas entre si y paralelas a uno de los movimientos de la placa las cuales fueron utilizadas para el montaje de tres dispositivos, dos de los cuales sirvieron para la sujeción de los meatos auditivo y en el tercero se montó una pinza para la fijación del hocico. Con estos tres puntos de sujeción el craneo del animal estaba perfectamente fijo a la placa base.

Sobre el vastago vertical se montó el equipo de micromanipulación e inyección con posibilidad de movimiento en todas las direcciones. El equipo de micromanipulación esta formado por un manipulador hidraulico Narishige mod.MD-103 con una precisión de 2 um. Dicho equipo consta de tres cilindros de desplazamiento, de los cuales se utilizaron dos para el movimiento del sistema de inyección según los ejes lateral y de profundidad, mientras que el tercero fué utilizado para mover el embolo de una jeringa

de 1 #1 de capacidad

El equipo de inyección, que fué diseñado al efecto, consta de una pieza de metacrilato que sirve de sujeción de la jeringa Hamilton y la micropipeta y a la cual se acopla del mismo modo uno de los cilindros del manipulador el cual se utiliza para el desplazamiento del embolo

Además, se disponia de una fuente de luz fria y de un microscopio estereoscópico Nikon mod. SM29 con una magnificación máxima de 40 diámetros.

2.2.2.- PREPARACION Y LLENADO DE LAS MICROPIPETAS

Las micropipetas fueron confeccionadas a partir de tubos de vidrio de 3 mm de diámetro mediante un estirador vertical Narishige mod. PN2. Las micropipetas se cortaban a una distancia aproximada de 1 mm del cuello y se sellaban con grasa de silicona con una antelación mínima de 24 horas a la operación quirúrgica, en los momentos previos a la inyección, las micropipetas se llenaban con la solución de peroxidasa mediante una jeringa Hamilton mod. 7001N. El sistema jeringa Hamilton-micropipeta servirá posteriormente para efectuar la inyección de HRP en el cerebro del reptil.

2.2.3.- LA SOLUCION DE HRP

Se utilizaron tres tipos de soluciones de HRP: en agua destilada, en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO)

al 2% y en una solución de saponina al 10%. A su vez se utilizaron distintas concentraciones de HRP que oscilaron entre el 2% y el 30%.

2.2.4.- LA INTERVENCION QUIRURGICA

Previamente a la intervención quirúrgica los animales fueron anestesiados. La anestesia utilizada para la inyección de HRP fué la misma que para la perfusión posterior. Se utilizaron primero vapores de eter etílico y posteriormente la anestesia se completaba con pentobarbital sódico que se inyectaba intraperitonealmente a razón de 0.0375 mgr/gr de peso del animal.

2.2.4.1.- Preparación del campo de inyección

Tras la sujeción del animal al aparato de estereotaxia se procede a la preparación del campo de operación. El primer paso del mismo consiste en la eliminación de las escamas córneas mediante una lanceta y unas pinzas, posteriormente y con el mismo instrumental se quita la fina piel que recubre la superficie del craneo. Durante esta fase son frecuentes las hemorragias las cuales pueden ser fácilmente cortadas mediante la aplicación de láminas de fibrina (Sponjostan).

Una vez el hueso queda al descubierto se procede a la trepanación del mismo para lo cual se hace uso de un

torno de marquetería con una fresa esférica de 1 mm de diámetro. La trepanación se efectuó de un modo intermitente hasta que el hueso comienza a quebrarse, en este momento se comienzan a quitar las astillas haciendo uso de unas pinzas finas hasta dejar limpio el orificio practicado apareciendo de este modo la ectomeninge a la vista.

La ectomeninge, al igual que la endomeninge puede cortarse de diversas formas, la que ha dado mejores resultados es mediante una lanceta hematológica. Practicado un pequeño corte, el resto se separa mediante unas pinzas finas quedando a la vista la endomeninge. Una de las formas de romperla es dejandola secar durante 5 minutos, otra manera es mediante la sujeción con unas pinzas y el corte mediante la punta de una micropipeta o el bisel de una aguja de jeringa.

2.2.4.2.- Implantación de la micropipeta

Una vez preparado el campo para la inyección de HRP se procede al acercamiento de la micropipeta al lugar de inyección, para lo cual se toman coordenadas estereotáxicas partiendo, como punto de referencia, del punto de unión de las placas parietales con la placa pineal. Se efectuaron inyecciones en distintos puntos de la corteza cerebral localizados bajo las placas parietales, occipitales, y en algún caso bajo la placa pineal. Como coordenada de profundidad se tomó la superficie cerebral

practicandose inyecciones desde 50 a 100 μ m en Podarcis y desde 70 a 150 en Gallotia .

Una vez implantada la micropipeta en el interior del cerebro se procede a la inyección de HRP accionando el cilindro del manipulador que mueve el embolo. En el proceso experimental se inyectaron desde 5 hasta 20 μ l de la solución de HRP. Las inyecciones se efectuaron en varias veces inyectandose la primera vez 5 μ l y cada 5 minutos 5 μ l hasta completar el volumen de inyección deseado. En este momento se dejaba difundir la solución con la micropipeta en el interior durante un tiempo de 10 minutos.

2.2.4.3.- Sellado de la herida

Concluida la inyección se retira la micropipeta y se procede al sellado de la herida, para lo cual se cubre la misma con cera de dentista y posteriormente con cemento de dentista.

Posteriormente se retira el animal del aparato de estereotaxia se marca y se coloca en un terrario preparado al efecto para animales operados.

2.2.4.4.- Tiempo de supervivencia

Después de la intervención los animales fueron mantenidos en los terrarios durante tiempos de supervivencia que oscilaron entre 2 horas y 11 días aún

cuando el tiempo de supervivencia más utilizado fué el de 6 días. Los animales anestesiados con eter se recuperaron inmediatamente, mientras que los que recibieron una inyección adicional de pentotal la recuperación oscilaba entre 3 y 12 horas.

2.3.- FIJACION

2.3.1.- SOLUCIONES UTILIZADAS

1) Suero salino: ClNa 0.9 % en agua destilada

2) Tampón fosfato 0.2M pH 7.4

-PO₄H₂Na 0.2M.....10 cc

-PO₄HNa₂ 0.2M.....40 cc

3) Fijador de Karnovsky (Graham & Karnovsky, 1965)

-Paraformaldehido al 8.33 %.....15 cc

-Agua destilada.....30 cc

-Glutaraldehido 25 %..... 5 cc

-Tampón fosfato 0.2M pH 7.4.....50 cc

Preparación: El fijador de Karnovsky se prepara según el orden especificado anteriormente. Para disolver el Paraformaldehido es necesario calentar la solución hasta 70o C en un agitador magnético, cuando se llega a esta temperatura se añaden a la solución unas gotas de NaOH 1N hasta que esta quede traslucida. Posteriormente se deja enfriar y se añaden el resto de componentes. Ajustando el pH de la solución a 7.4

- 4) Solución tamponada de lavado
- Sacarosa.....10 gr
 - Agua destilada.....50 cc
 - Tampón fosfato 0.2M pH 7.4.....50 cc

2.3.2.- PERFUSION

Tras anestesiar a los animales se les abre rápidamente la caja torácica quedando de este modo el corazón al descubierto, en este momento se quita el el pericardio mediante un corte en el mismo introduciendose posteriormente en el corazón una aguja de cateter, es necesario aliviar la presión del torrente circulatorio mediante varios cortes en el hígado. Posteriormente se inyecta a través del corazón el suero salino hasta que los tejidos queden blanquecinos, se necesitaron de 5 a 10 cc para Podarcis y alrededor de 20 cc para Gallotia . Posteriormente y por el mismo conducto se introduce el fijador de Karnovsky (solución 2) inyectandose alrededor de 40 cc para Podarcis y alrededor de 100 cc para Gallotia hasta que el animal estuviese completamente rígido.

2.3.3.- EXTRACCION DEL CEREBRO

Finalizada la perfusión se procede a la extracción del cerebro, para lo cual se decapita al animal y se practican tres cortes, uno por detrás de las placas

occipitales y los otros dos siguiendo los bordes laterales de las placas parietales y frontal hasta llegar al hocico. Posteriormente se levantan las placas craneales dorsales quedando las ectomeninges al descubierto, las cuales se quitan con ayuda de unas pinzas finas.

A continuación se practica una incisión en el hueso escamoso introduciendo la punta de la tijera a través de la medula espinal, posteriormente se separan las dos mitades quedando de este modo el cerebro al descubierto el cual tras cortar los nervios craneales y el quiasma óptico queda suelto y ya se puede extraer.

2.3.4.- POSTFIJACION Y LAVADO

Una vez extraído el cerebro se deposita en un frasco con solución de Karnovsky (solución 2) a 40 C durante un tiempo que varió entre 3 y 12 horas, aunque la mayoría permanecieron en esta solución durante 4 horas.

Posteriormente se procedió al lavado del fijador pasando los cerebros a la solución de lavado (solución 3) a 40 C durante un tiempo variable superior a las 8 horas e inferior a 48. La función de la sacarosa en la solución de lavado es la de crioprotección al evitar la formación de critales de hielo durante la congelación posterior.

2.4.- REVELADO DE LA HRP

2.4.1.- MICROTOMIA DE CONGELACION

Para la realización de las series de cortes se dispone de una platina de congelación eléctrica Komatsu mod. MA-101 acoplada a un microtomo Reitchert-Jung mod. OM-P. Se obtuvieron series de cortes de 50 μ m desde los pedunculos olfativos hasta los niveles posteriores al cerebelo y en algunos casos se cortaron además los bulbos olfativos.

La congelación se realiza lo más rápidamente posible para evitar la formación de critales de hielo en el interior del tejido. La superficie del corte, en cambio ha de estar parcialmente descongelada para evitar una excesiva resistencia al paso de la cuchilla.

Los cortes se recogen en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 en sacarosa al 5% en bandejas de pocillos en el fondo de los cuales se practicaron una serie de orificios para permitir el flujo entre el pocillo y la bandeja en la cual se depositaban las distintas soluciones.

2.4.2.- REACCION HISTOQUIMICA

En el proceso experimental se utilizaron tres técnicas histoquímicas para el revelado de la HRP con distintos cromógenos y/o estabilizantes: a) el primero con

diamino benzidina (DAB) como cromógeno (La Uail & La Uail, 1974), b) el segundo con tetrametil benzidina (TMB) como cromógeno y nitroprusiato sódico (NPS) como estabilizante (Mesulam, 1978) y c) el tercero utilizando tetrametil benzidina (TMB) como cromógeno y heptamolibdato amónico (HMA) como estabilizante (Olucha et al., 1985). Esta última técnica fué puesta a punto expresamente para el presente estudio, y además fué la más utilizada. En algunos casos se obtuvieron series paralelas que se revelaron con dos de los métodos señalados.

2.4.2.1.- El método de DAB (La Uail & La Uail, 1974)

A) Soluciones

1.- Solución tampón

-Tampón fosfato 0.2M pH 7.4.....50 cc

-Agua destilada.....50 cc

2.- Solución de preincubación

-Diamino benzidina (Sigma).....50 mgr

-Solución 1 (tampón).....100 cc

3.- Agua oxigenada

-Agua oxigenada (110 vol.).....0.3 cc

-Agua destilada.....100 cc

B) Procedimiento

Los cortes recogidos en tampón fosfato con sacarosa se lavan dos veces en la solución 1 durante 30 segundos cada vez en agitación. Posteriormente se pasaron a la

solución de preincubación de DAB (solución 2) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se añade a la solución anterior 1 cc de agua oxigenada (solución 3) por cada 100cc de medio de incubación (solución 2) hasta que el agua oxigenada en el medio de incubación alcance una concentración de 0.006 %. Los cortes adquieren una tonalidad parda de fondo y en el lugar de inyección marrón oscuro. Concluida la reacción histoquímica los cortes se lavan mediante varios baños de agua destilada y se montan en portaobjetos untados con gelatina alumbre de cromo.

2.4.2.2.- El método TMB-NPS (Mesulam, 1978)

A)Soluciones

1.- Tampón acetato pH 3.3

- Acetato sódico 1M.....100 cc
- ClH 1M..... 95 cc
- Agua destilada.....hasta 500 cc

Es necesario ajustar el pH de esta solución a 3.3

2.- Solución de nitroprusiato sódico (NPS)

- NPS (Merck o Sigma).....100 mgr
- Tampón acetato (solución 1).... 5 cc
- Agua destilada.....92.5 cc

3.- Solución de tetrametil benzidina (TMB)

- TMB Sigma..... 5 mgr
- Alcohol absoluto.....2.5 cc

La TMB se disuelve en estufa a 40o C

4.- Medio de incubación

-Solución de NPS (sol. 2).....97.5 cc

-Solución de TMB (sol. 3)..... 2.5 cc

Las soluciones 2 y 3 se preparan por separado en el momento del revelado y se mezclan en ese momento. La solución debe tomar una coloración azulada, las tonalidades verdosas y marrones indican contaminación del medio.

5.- Solución de agua oxigenada

-Agua oxigenada (100 vol.).....0.3 cc

-Agua destilada.....100 cc

6.- Solución de lavado

-Tampón acetato (sol. 1)..... 5 cc

-Agua destilada..... 95 cc

B) Procedimiento

Los cortes recogidos en tampón fosfato-sacarosa se lavaron mediante 6 baños de agua destilada de 30 segundos cada uno en agitación.

Tras los baños de lavado, los cortes son transferidos a la solución de incubación (sol. 4) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se añade cada 5 minutos 1 cc de la solución de agua oxigenada (sol. 5) por cada 100 cc de medio de incubación hasta que el punto de inyección aparezca con un color azul oscuro. La reacción histoquímica va acompañada de la formación de gran número

de cristales aciculares que se depositan alrededor de los cortes. Generalmente se necesitaron 3 cc de solución de agua oxigenada para completar la reacción histoquímica.

Posteriormente, los cortes se pasan por sendos baños de lavado (sol. 6) hasta que queden libres de precipitados aciculares tras lo cual se procede al montaje de las series en portas untados con gelatina alumbre de cromo.

2.4.2.3.- El método TMB-HMA (Olucha et al., 1985a)

A) Soluciones

1.- Tampón fosfato pH 6

- Fosfato monosódico 0.2M.....50 cc
- Agua destilada.....50 cc
- NaOH 1N añadir hasta que el pH de la solución llegue hasta 6.0

2.- Solución de heptamolibdato amónico (HMA)

- HMA (Panreack).....250 mgr
- Tampón fosfato pH 6 (sol. 1)...97.5 cc

3.- Solución de tetrametil benzidina (TMB)

- TMB Sigma..... 5 mgr
- Alcohol absoluto.....2.5 cc

Al igual que en el caso anterior la solución de TMB debe prepararse en el momento de la reacción en estufa a 40°C

4.- Medio de incubación

-Solución de HMA (sol.2).....97.5 cc

-Solución de TMB (sol.3)..... 2.5 cc

5.- Solución de agua oxigenada

-Agua oxigenada 110 vol. 0.3 cc

-Agua destilada..... 100 cc

B) Procedimiento

Los cortes recogidos en tampón fosfato a pH 7.4 con sacarosa se pasan por un lavado previo con agua destilada durante 30 segundos y posteriormente por dos lavados con tampón a pH 6 (sol. 1).

A continuación se procede a la reacción histoquímica transfiriendo los cortes a la solución de incubación (sol.4) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 2 cc de la solución de agua oxigenada (sol.5) por cada 100 cc de medio de incubación cada 5 minutos, hasta que el punto de inyección aparezca con un color azul intenso. El medio de incubación ha de permanecer durante el transcurso de la reacción histoquímica traslucido, las coloraciones azuladas indican contaminación del mismo. El agua oxigenada en el medio de incubación puede alcanzar concentraciones de hasta 0.09 %.

Tras la reacción histoquímica los cortes son transferidos a la solución de tampón fosfato a pH 6 y tras un breve lavado en agua destilada son montados en portaobjetos untados con gelatina alumbre de cromo.

2.4.3.- MONTAJE DE LAS SERIES Y TINCION DE CONTRASTE

A) Soluciones

1.- Gelatina

-Gelatina molida..... 4.5 gr

-Agua destilada.....1000 cc

Para disolver la gelatina se calienta al baño maria dejandose enfriar posteriormente hasta temperatura ambiente

2.- Alumbre de cromo

-Alumbre de cromo al 4%.....38.5 cc

-Ftalato de dibutilo..... 1 cc

-Timol..... 0.1 gr

3.- Solución de trabajo

-Solución de gelatina (sol. 1)... 5 cc

-Solución de alumbre (sol. 2)... 5 cc

-Agua destilada..... 100 cc

4.- Coloración de contraste con azul de toluidina para DAB

-Azul de toluidina 0.5 gr

-Agua destilada..... 100 cc

5.- Coloración de contraste con rojo neutro para TMB-NPS

-Rojo neutro..... 1 gr

-Agua destilada..... 95 cc

-Tampón acetato a pH 3.3

(solución 1 del apartado 2.7.2.2) 5 cc

6.- Coloración de contraste con rojo neutro
para TMB-HMA

-Rojo neutro..... 1 gr

-Agua destilada..... 100 cc

B) Procedimiento

Los portaobjetos sobre los cuales se montan las series de cortes se mojan previamente en la solución de trabajo de gelatina alumbre de cromo (sol. 3) tras lo cual se dejan secar en una estufa a 40°C.

Posteriormente las series de cortes se montan sobre los portaobjetos preparados al efecto y se dejan secar al aire durante una noche protegidos del polvo.

A continuación se procede a la tinción de contraste para lo cual previamente se lava el exceso de gelatina con alcohol de 70 % durante 30 segundos, un lavado posterior con agua destilada y finalmente se cubren los portaobjetos con el colorante de contraste correspondiente según la técnica utilizada (sols. 4, 5 y 6) durante 1 minuto. Transcurrida la diferenciación se lava el colorante con alcohol de 70 % primero y de 96 % posteriormente este último además sirve para eliminar el exceso de colorante. Se considera que los cortes están bien diferenciados cuando adquieren un color azul tenue con azul de toluidina o rosa claro con rojo neutro, en ambos casos se han de poder observar a simple vista los estratos de somas de las distintas regiones corticales.

Tras la coloración y la diferenciación posterior los cortes son deshidratados en alcohol absoluto, aclarados en Xileno y cubiertos con cubreobjetos en los que se depositan varias gotas de agente de montaje (DPX o Eukitt).

2.5.- ESTUDIO DE LAS SERIES

Las series histológicas fueron estudiadas y fotografiadas en su caso con un fotomicroscopio Zeiss III y algunas de ellas dibujadas con un microscopio Olympus equipado con cámara clara.

En el estudio de las series se atendió en primer lugar al punto de inyección valorandose fundamentalmente las difusiones a las áreas adyacentes al punto de inyección, así como la magnitud de la inyección. Posteriormente se estudió la localización de los somas neuronales marcados retrógradamente y los fascículos que utilizan sus axones hasta alcanzar el punto de inyección para lo cual resulto muy útil el dibujo de las series.

Las eferencias se estudiaron a dos niveles: las localizadas en el hemisferio de inyección y las localizadas a una distancia considerable respecto al mismo. Las primeras no representaron ningún problema debido a la intensidad del marcaje anterógrado mientras que para observar las segundas generalmente fué necesario la utilización de objetivos de 40 o 100 aumentos salvo en los

casos de inyecciones masivas.

Siempre que fué posible se efectuaron inyecciones de comprobación en las zonas en las cuales aparecia marcaje anterógrado.

Tabla II.- Cuadro de ejemplares utilizados

número	especie	cromógeno	pto.		tiempo		efer.	afer
			inyec.	difus.	superv.			
271	P. h.	DAB	M1-M2		4 h		+	
272	P. h.	DAB	M1-M2	D1	2 h			+
352	P. h.	TMB-HMA	M2	D1	6 h	+		+
354	P. h.	TMB-HMA	M2-D1	D3	12 h	+		++
359	P. h.	TMB-HMA	D	M2	24 h	+		+
398	P. h.	DAB	M2-D		24 h	++		+
399	P. h.	DAB	M2-D		24 h	++		+
416	P. h.	DAB	M2	M1-D1	2 d	+		+
537	P. h.	TMB-NPS	M2-D	M1	3 d	++		+++
539	P. h.	TMB-NPS	M2-D	M1	4 d	++		+++
548	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
550	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
578	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
579	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
580	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
589	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
591	P. h.	p:AHM-NPS	M2-D	M1	6 d	+++		+++
804	P. h.	p:AHM-DAB	D1-D3	D2	24 h	++		+
837	G. s.	TMB-AHM	M2	D1	6 d	+++		+++
842	G. s.	TMB-AHM	D3-M2	D2	6 d	+++		+++
845	G. s.	TMB-AHM	M2		5 d	+++		+++
846	G. s.	TMB-AHM	M2	M1	7 d	+++		+++
847	G. s.	TMB-AHM	M2	M1-D1	7 d	+++		+++
849	G. s.	TMB-AHM	M2	M1-D1	7 d	+++		+++

número	especie	cromógeno	pto.		tiempo	afer	efer
			inyec.	difus.	superv.		
873	P. h.	TMB-HMA	D3-L		6 d	+++	++
874	P. h.	TMB-HMA	D3-L		5 d	+++	++
898	P. h.	TMB-HMA	M2-D1	D2	6 d	+++	++
903	P. h.	TMB-HMA	M2-D	M1	6 d	+++	+++
927	P. h.	TMB-HMA	D2-D3	L-DVR	6 d	+++	+++
928	P. h.	TMB-HMA	L		6 d	+++	+++
934	P. h.	TMB-HMA	M1		6 d	+++	+++
956	P. h.	TMB-HMA	D2-D3	L	9 d	+++	+++
957	P. h.	TMB-HMA	L-D3	NOA	6 d	+++	+++
958	P. h.	TMB-HMA	L-D3		6 d	+++	+++
959	P. h.	TMB-HMA	D2	D3	5 d	+++	+++
966	P. h.	TMB-HMA	M2	M1	5 d	+++	++
970	P. h.	TMB-HMA	M2-M1		7 d	++	+
982	P. h.	TMB-HMA	D1-D2	D3	7 d	+++	+++
986	P. h.	TMB-HMA	L		7 d	+++	+++
1071	P. h.	TMB-HMA	D2-D3	L-DVR	6 d	+++	+++
1370	P. h.	TMB-HMA	M2-D1	D3	6 d	+++	+++
1373	P. h.	TMB-HMA	M2-D1		6 d	+++	+++
1378	P. h.	TMB-HMA	M2-D1	D3	3 d	+	+++
1412	P. h.	TMB-HMA	D2-D3		6 d	+++	+++
1419	P. h.	TMB-HMA	BOA		7 d	+++	+++
1420	P. h.	TMB-HMA	D2		6 d	+++	+++
1422	P. h.	TMB-HMA	BOA		5 d	+++	+++
1423	P. h.	TMB-HMA	BOP		6 d	+++	+++
1425	P. h.	TMB-HMA	BOP		7 d	+++	+++

			pto.		tiempo		
<u>número</u>	<u>especie</u>	<u>cromógeno</u>	<u>inyec.</u>	<u>difus.</u>	<u>superv.</u>	<u>afer</u>	<u>efer</u>
2109	G. s.	TMB-HMA	D2-D3	D1-DVR	7 d	+++	+++
2110	G. s.	TMB-HMA	M2	M1-D1	8 d	+++	+++

ABREVIATURAS:

G.s.: Gallotia stehlinii ;

P.h.: Podarcis hispanica ;

DAB:diamino benzidina;

p:HMA-DAB: series paralelas reveladas con diamino benzidina
y tetrametil benzidina-heptamolibdato amónico;

p:HMA-NPS: series paralelas reveladas con tetrametil
benzidina-nitroprusiato sódico y tetrametil
benzidina-heptamolibdato amónico;

TMB-HMA: tetrametil benzidina-heptamolibdato amónico;

TMB-NPS: tetrametil benzidina-nitroprusiato sódico;

pto. inyec.: punto de inyección;

D: cortex dorsal;

D1: subregión medial del cortex dorsal;

D2: subregión intermedia del cortex dorsal;

D3: subregión lateral del cortex dorsal;

L: cortex lateral;

M1: cortex medial;

M2: cortex dorsomedial.

difus.: área de difusión;

DVR: cresta ventricular dorsal;

NOA: núcleos olfativos anteriores.

tiempo superv.: tiempo de supervivencia;

d: días

h: horas

afer.: aferencias;

efer: eferencias

RESULTADOS

3.1.- LA TECNICA

3.1.1.- AREA DE DIFUSION

3.1.2.- TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA

3.1.3.- DETECCION DE LA TRAZA

3.2.- DESCRIPCION CITOARQUITECTONICA DE LAS AREAS DORSOMEDIAL Y DORSAL

3.2.1.- EL CORTEX DORSOMEDIAL

3.2.2.- EL CORTEX DORSAL

3.3.- AFERENCIAS A LAS AREAS CORTICALES DORSOMEDIAL Y DORSAL

3.3.1.- EL CORTEX MEDIAL

3.3.2.- EL CORTEX DORSOMEDIAL

3.3.3.- EL CORTEX LATERAL

3.3.4.- ESTRUCTURAS DEL TELEENCEFALO
BASAL

3.3.5.- LA PROYECCION TALAMICA

3.3.6.- LOS CUERPOS MAMILARES

3.3.7.- EL NUCLEO DEL RAPE

3.4.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS AL CORTEX DORSOMEDIAL

3.4.1.- EL CORTEX DORSAL

3.5.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS AL CORTEX DORSAL

3.5.1.- LOS NUCLEOS OLFATIVOS ANTERIORES

3.5.2.- EL NUCLEO ESFERICO

3.5.3.- EL AREA TRIANGULARIS

3.6.- AFERENCIAS DEL CORTEX DORSOMEDIAL

3.6.1.- SALIDA DE AXONES EFERENTES

3.6.2.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX
MEDIAL

3.6.2.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX
DORSAL

3.6.3.- EFERENCIAS SOBRE EL PROPIO
CORTEX DORSOMEDIAL

3.6.4.- EFERENCIAS SOBRE EL SEPTUM

3.7.- EFERENCIAS DEL CORTEX DORSAL

3.7.1.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION
MEDIAL (D1)

3.7.2.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION
INTERMEDIA (D2)

3.7.3.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION
LATERAL (D3)

3.1.- LA TECNICA

Antes de considerar la localización de los somas neuronales y axones que aparecen marcados, es necesario valorar en primer lugar los factores que influyen en el desarrollo de la técnica utilizada. De entre ellos se han considerado como más importantes los que afectan al área de difusión, el tiempo de supervivencia, y la técnica de detección de la peroxidasa inyectada.

3.1.1.- AREA DE DIFUSION

En el desarrollo experimental del presente trabajo, en el mejor de los casos se han obtenido áreas de difusión de 200 μ m de diámetro. En la figura 3.1 aparecen dibujados mediante cámara clara ejemplares representativos de inyecciones más o menos restringidas en las distintas regiones o subregiones corticales. No obstante, en muchos casos fué necesario el estudio de ejemplares de inyecciones masivas o con inyecciones en zonas de solapamiento entre dos áreas para asegurar la existencia de una determinada proyección.

Los parametros que más afectaron al área de difusión fueron el volumen de solución inyectada y la concentración de la HRP en dicha solución.

Respecto al volumen inyectado los mejores resultados se obtuvieron con volúmenes de 20 μ l en el caso

de Gallotia stehlinii y de 10 nl en el caso de Podarcis hispanica. No obstante, es necesario señalar que dichos volúmenes varían considerablemente dependiendo de otros factores como son la concentración de HRP o el diámetro de la micropipeta.

La concentración de HRP que ha sido observada como óptima en el presente trabajo oscila entre el 15 y el 20 % (p/v) de HRP en dimetil sulfoxido (DMSO) al 2 % o saponina al 10 %. Concentraciones superiores de HRP impiden la salida de la solución a través de la punta de la micropipeta.

3.1.2.- TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA

Los tiempos de supervivencia óptimos para el estudio de las conexiones neuronales en este modelo experimental, tanto en lo referente a aferencias como en lo que respecta a eferencias, deben ser superiores a 4 días. Los tiempos inferiores tan solo permiten el estudio de las conexiones referidas al hemisferio donde se inyectó el enzima. No obstante, hay que señalar que se puede observar la presencia de marca en el interior del cuerpo neuronal ya desde las 2 horas después de la administración del enzima en las zonas próximas al punto de inyección (Fig. 3.2 b). Por otra parte, el transporte anterógrado se hace patente con anterioridad al retrógrado, de tal modo que se puede observar marcaje puntiforme en el hemisferio ipsilateral a

la inyección ya desde las 12 horas y sin embargo, somas neuronales en la misma región no son observables hasta transcurridas las 24 horas (Fig. 3.2 a).

Los tiempos de supervivencia largos (superiores a 4 días) favorecen una buena acumulación de la peroxidasa en las neuronas situadas incluso en los puntos más alejados respecto al de inyección, conservándose al mismo tiempo el marcaje correspondiente al transporte anterógrado (Fig. 3.2 b y c).

El tiempo de supervivencia más largo ha sido el de 10 días, en el cual tan sólo se observa un ligero descenso en la cantidad de producto de reacción presente en el punto de inyección.

3.1.3.- DETECCION DE LA TRAZA

En el desarrollo experimental se han utilizado tres técnicas de detección de la HRP: Diamino Benzidina (DAB), Tetrametil Benzidina-Nitroprusiato Sódico (TMB-SNF) y Tetrametil Benzidina-Heptamolibdato Amónico (TMB-AHM).

La DAB da lugar a un producto de reacción de color marrón oscuro de mayor o menor intensidad según el grado de incorporación de la traza. Este producto de reacción es de grano fino y se presenta de forma difusa tanto en el soma neuronal como en axones y dendritas de neuronas bien marcadas (Fig. 3.2 a y b)

La técnica produce un marcaje de fondo de modo que

el tejido aparece con una tonalidad parduzca, lo cual, en determinadas ocasiones dificulta la observación de estructuras neuronales marcadas.

El método TMB-NPS da un producto de reacción de color azul oscuro y de forma granular, siendo perfectamente perceptible en campo claro. Por otra parte, dos componentes artefactuales son inherentes al presente método: la constante presencia de un precipitado acicular cristalino en el interior del tejido y la intensa retracción de los cortes, causa directa de los bajos pHs (3.3-3.7) a los cuales tiene lugar la reacción histoquímica (Fig. 3.2 c y d).

Cuando a los cortes de tejido se aplica el método TMB-AHM, el producto de reacción aparece con una intensa coloración azul-verdosa en forma de gruesos granulos. La característica más sobresaliente de este último método es la practica ausencia de artefactos; tan sólo una pequeña retracción del tejido debido a que el pH al cual tiene lugar la reacción esta ligeramente por debajo del fisiológico (pH 6) (Fig. 3.2 e)

Fig. 3.1.- Inyecciones representativas en las distintas áreas corticales.

- a) Gallotia stehlinii , ejemplar 845; inyección en el cortex dorsomedial con difusión al cortex medial.
- b) Gallotia stehlinii , ejemplar 837; inyección en el cortex dorsomedial con difusión a la subregión D1 del cortex dorsal.
- c) Podarcis hispanica , ejemplar 982; inyección en la subregión D3 a niveles caudales con difusión a D1 y D2.
- d) Podarcis hispanica , ejemplar 1420; inyección en la subregión D2 del cortex dorsal.
- e) Podarcis hispanica , ejemplar 958; inyección en la subregión D3 del cortex dorsal, con difusión al cortex lateral.
- f) Podarcis hispanica , ejemplar 986; inyección restringida en el cortex lateral.

FIGURA 3.1

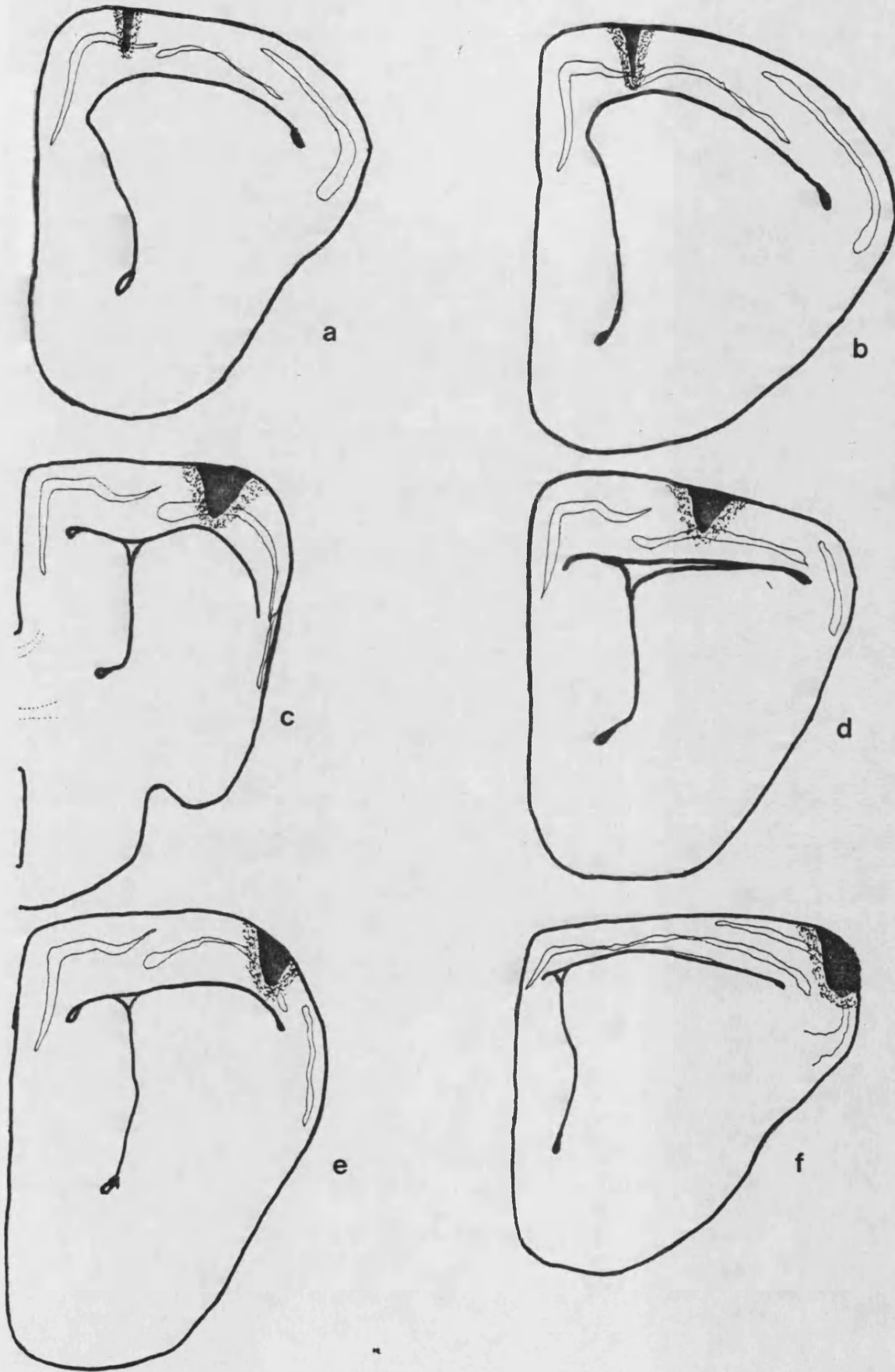


Fig. 3.2.- Resultados comparativos de las tres técnicas de detección de HRP utilizadas.

a) DAB. Marcaje anterógrado* en el cortex dorsomedial ipsilateral a 12 horas de supervivencia (Barra de referencia 100 um)

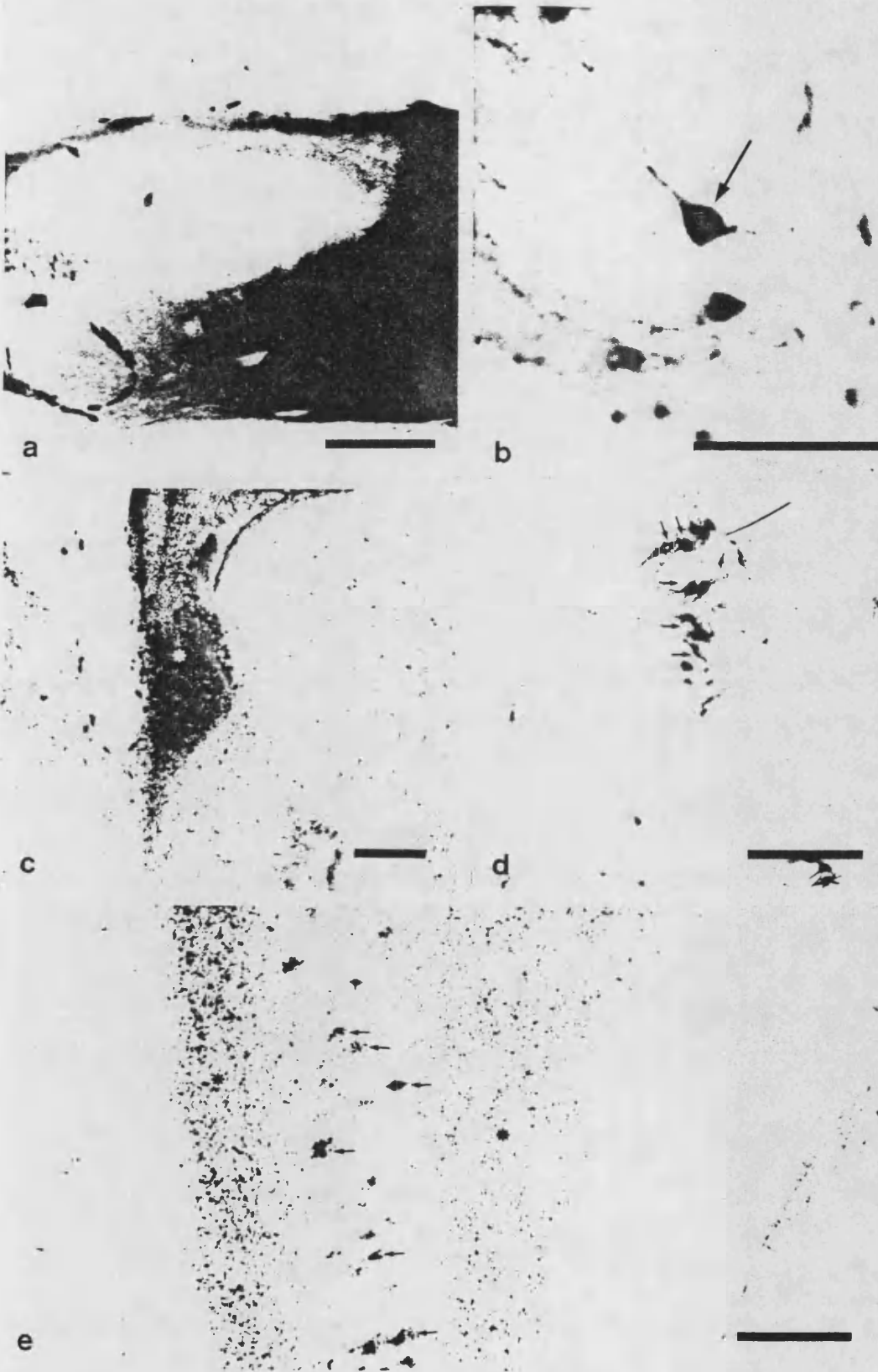
b) DAB. Marcaje retrógrado[†] en el cortex dorsomedial tras inyección de HRP en la misma región cortical y 2 horas de supervivencia (Barra de referencia 50 um)

c) TMB-NPS. Marcaje anterógrado* en la región septal tras una inyección masiva que abarcó las áreas corticales medial, dorsomedial y dorsal y 3 días de supervivencia. (Barra de referencia 100 um)

d) TMB-NPS. Marcaje retrógrado[†] en el núcleo del rafe superior en el mismo ejemplar que el representado en (c). (Barra de referencia 100um)

e) TMB-HMA. Marcaje anterógrado* y retrógrado[†] en el cortex medial ipsilateral tras inyección en el cortex dorsomedial y 6 días de supervivencia. (Barra de referencia 50 um)

FIGURA 3.2



3.2.- DESCRIPCION CITARQUITECTONICA DE LAS AREAS DORSOMEDIAL Y DORSAL

Las áreas corticales dorsomedial y dorsal de las dos especies de reptiles Squamata estudiadas presentan un desarrollo particular a lo largo de los ejes rostro-caudal y medio-lateral por lo que conviene, antes de adentrarse en el modelo de conexiones que presentan, hacer una referencia a la conformación de los mismos.

3.2.1.- EL CORTEX DORSOMEDIAL

En las dos especies de reptiles estudiadas no se han observado diferencias cualitativas en cuanto a la organización de esta región cortical.

En cortes transversales se observa una clara estratificación en el cortex dorsomedial a cualquier nivel, de tal modo que se pueden apreciar tres capas que desde la membrana glial hasta el epéndimo son: la capa plexiforme externa, el estrato de somas y la capa plexiforme interna (Fig. 3.3). En la capa plexiforme externa se pueden observar dos áreas con texturas ligeramente distinta: una superficial ocupada por fibras que cursan en dirección medioventral y una profunda que ocupa los 2/3 proximales al estrato de somas que es positiva al método de Timm. Del mismo modo, en la porción periependimaria de la capa plexiforme interna se sitúan un conjunto de fibras

mielínicas denominadas "alveus" (Fig. 3.3 c).

Por otra parte, la extensión del cortex dorsomedial es distinta a lo largo del eje rostro-caudal. Esta región cortical comienza a aparecer rostralmente a niveles precomisurales entre el cortex dorsal y el cortex medial, presentando una escasa longitud (Fig. 3.3 a). A niveles comisurales, el cortex dorsomedial se extiende lateralmente sobre el cortex dorsal apareciendo una capa plexiforme intermedia entre ambas regiones corticales (Fig. 3.3 b y c). Por último, a niveles postcomisurales el área dorsomedial ocupa la mayor parte de la superficie dorsal de la corteza cerebral (Fig. 3.3 c).

3.2.2.- EL CORTEX DORSAL

El esquema de estratificación del cortex dorsal es básicamente el mismo que el observado para el cortex dorsomedial. De tal modo que de la membrana glial hasta el epéndimo se pueden definir una capa plexiforme externa un estrato de somas y una capa plexiforme interna, no obstante, la organización de cada una de las capas varía en cada una de las subregiones de esta región cortical (Fig. 3.4).

El cortex dorsal comienza a aparecer rostralmente entre las áreas medial y lateral antes de la aparición del cortex dorsomedial. En los niveles medios (comisurales), esta región cortical presenta su máxima extensión ocupando

la practica totalidad de la extensión dorsal de la corteza cerebral. En los niveles caudales, el cortex dorsal se desplaza lateralmente al mismo tiempo que el cortex lateral se hace ventral hasta desaparecer. El cortex dorsal desaparece posteriormente a la vez que se expansiona el cortex dorsomedial (Fig. 3.4 d).

En el cortex dorsal se pueden diferenciar tres subregiones que en el sentido mediolateral son: la subregión medial (D1), la subregión intermedia (D2) y la subregión lateral (D3).

El extremo rostral del cortex dorsal esta ocupado por la subregión D3 que se continua hasta los niveles más caudales. Esta subregión esta a su vez dividida en dos porciones una rostral que presenta unos somas con empaquetamiento laxo (Fig. 3.4 a) y una porción caudal con somas ligeramente más pequeños y dispuestos de un modo más compacto (Fig. 3.4 d).

En los niveles en los cuales aparece el cortex dorsomedial comienza a diferenciarse la subregión D2 en el extremo medial del cortex dorsal en la que los somas se disponen en un estrato compacto de 2 a 4 células de espesor observandose asimismo una inflexión entre las subregiones D2 y D3 (Fig. 3.4 b).

En los niveles comisurales aparece la subregión medial (D1) que se continua con D2. En esta subregión los somas neuronales se disponen laxamente de tal modo que en ocasiones no es aparente la existencia de un estrato de

somas; por otra parte, la capa plexiforme interna de esta subregión está ocupada por gran número de somas neuronales de formas diversas que se extienden hacia porciones mediales constituyendo el denominado "cell plate". D1 se extiende hasta los niveles más caudales apareciendo en los mismos en continuidad con la subregión lateral (Fig. 3.4 c y d).

Fig. 3.3.- Citoarquitectura del cortex dorsomedial y su desarrollo a lo largo del eje rostro-caudal.

a) nivel rostral, b) nivel comisural, c) nivel caudal. Observese que el cortex dorsomedial se extiende por encima del cortex dorsal en los niveles más caudales.

Abreviaturas: alv, alveus; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CM, cortex medial; ep, ependimo; es, estrato de somas; pl ex, capa plexiforme externa; pl in, capa plexiforme interna; pl im, capa plexiforme intermedia. Barra de referencia 200 um.

FIGURA 3.3

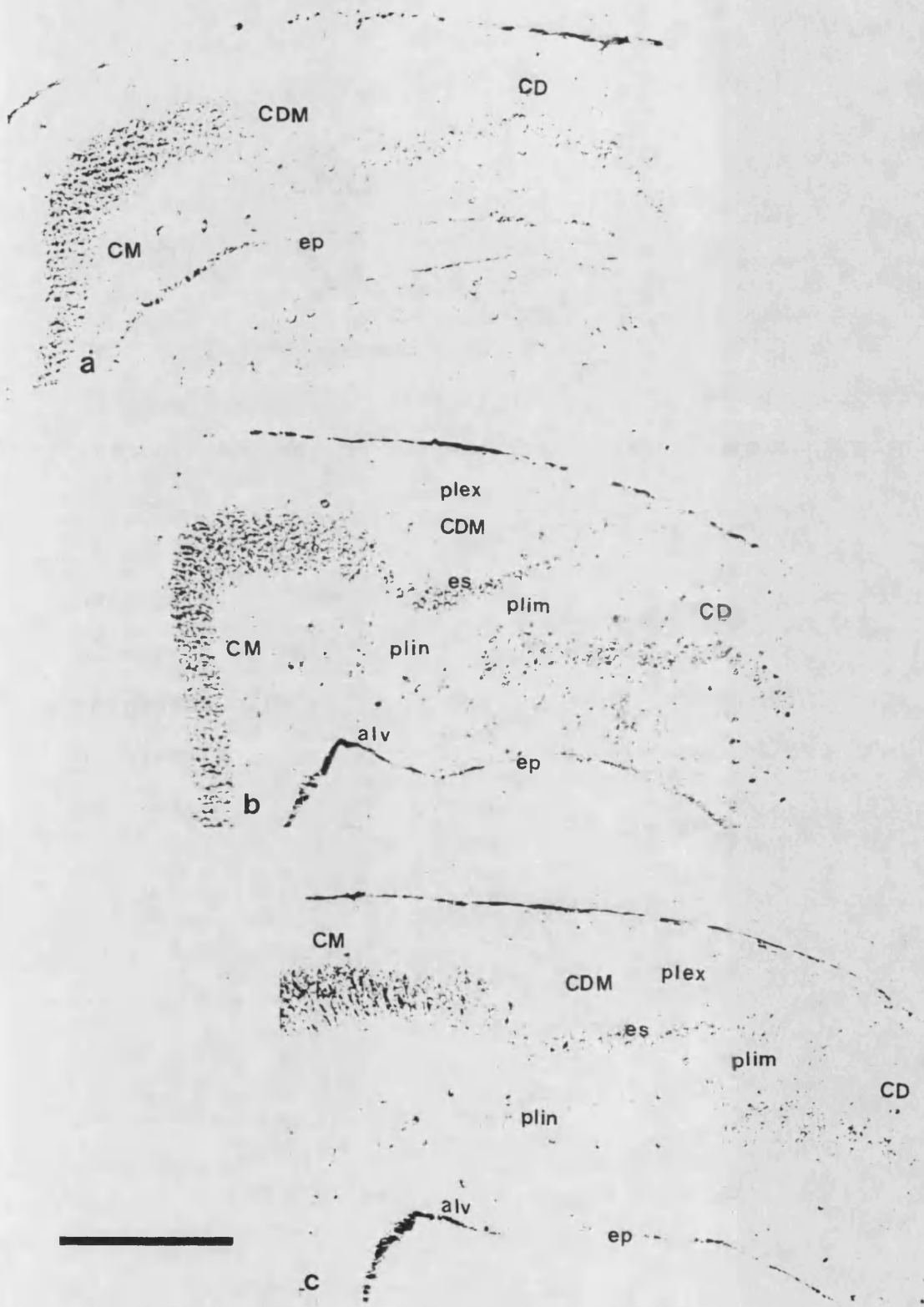


Fig. 3.4.- Citoarquitectura del cortex dorsal y su desarrollo a lo largo del eje rostro-caudal. Observese el orden de aparición de las distintas subregiones del cortex dorsal.

Abreviaturas: CM, cortex medial; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial, CL, cortex lateral; D1, subregión medial; D2, subregión intermedia; D3c, porción caudal de la subregión lateral; D3r, porción rostral de la subregión lateral; es, estrato de somas; pl ex, capa plexiforme externa; pl in, capa plexiforme interna. Barra de referencia 200 um.

FIGURA 3.4



3.3.- AFERENCIAS A LAS AREAS DORSOMEDIAL Y DORSAL

Con fines expositivos las aferencias comunes a las áreas dorsomedial y dorsal han sido representadas en dos grupos: aferencias telencefálicas (cortex medial, cortex lateral y estructuras del telencéfalo basal) en la figura 3.5; y aferencias extratelencefálicas (núcleo dorsolateral anterior del tálamo, cuerpos mamilares y núcleo del rafe) en la figura 3.15.

3.3.1.- EL CORTEX MEDIAL

Tanto en los casos de inyecciones restringidas al cortex dorsomedial, como en aquellos en los que la difusión del enzima abarcó únicamente algunas de las subregiones del cortex dorsal, se observó la constante presencia de somas retrógradamente marcados en el cortex medial. Dichos somas neuronales se localizan fundamentalmente en el estrato granular, y muy ocasionalmente en las capas plexiformes externa e interna.

Se han observado 4 tipos de neuronas marcadas en el estrato de somas, a las que se ha denominado: a) alargadas grandes, b) granulares pequeñas, c) fusiformes superficiales y d) triangulares superficiales.

a) Alargadas grandes (Fig. 3.6 b). Tienen un soma fusiforme o triangular y aparecen siempre con su eje mayor orientado perpendicularmente al estrato de somas. La

longitud del eje mayor oscila entre 20 y 30 μm y la del eje menor es aproximadamente de 10 μm . Normalmente se pueden observar dos segmentos dendríticos que parten de los polos de la célula y se dirigen hacia las capas plexiformes externa e interna donde se ramifican, aunque en ocasiones es posible observar la salida de dos ramas dendríticas que parten del extremo basal de la neurona y se ramifican en la capa plexiforme interna. El axón parte, también del polo basal y se pierde en la capa plexiforme interna.

b) Granulares pequeñas (Fig. 3.6 b). Es el tipo neuronal que con mayor frecuencia aparece marcado dentro del conjunto de las que constituyen el estrato granular del cortex medial. Presentan un soma fusiforme o poligonal de 10 μm de diametro aproximadamente; estas neuronas no ocupan una localización precisa dentro del estrato granular, de tal modo que se las puede observar tanto en la superficie externa como en la interna o en el interior del citado estrato. En el mejor de los casos, se pueden observar los segmentos iniciales tanto de sus arborizaciones dendríticas como de la prolongación axónica, que permite definir la tipología neuronal. Presentan dos ramas dendríticas que parten del polo apical y se pierden en la capa plexiforme externa; en ocasiones, también es posible observar alguna corta dendrita basal. El axón sale del polo basal hacia la capa plexiforme interna.

c) Fusiformes superficiales (Fig. 3.6 c). Estas neuronas aparecen marcadas en cualquiera de las subregiones

del cortex medial y en todos los niveles (roostro-caudales) en los que es posible observar neuronas marcadas. Se localizan en el límite entre el estrato de somas y la capa plexiforme externa y presentan una morfología entre ovalada y fusiforme orientándose con su eje mayor paralelo a la superficie del estrato de somas. De los dos polos parten sendas dendritas que se ramifican a lo largo de la superficie de separación de los estratos de somas y plexiforme externo.

d) Triangulares superficiales (Fig. 3.6 d). Se sitúan en el límite entre el estrato de somas y la capa plexiforme externa. Presentan una forma triangular con un vértice orientado hacia el interior del estrato de somas y el lado opuesto definiendo el límite de este estrato con la capa plexiforme externa. Del vértice basal parte una prolongación con aspecto de axón que se dirige a la capa plexiforme interna y de los vértices apicales parten dos dendritas que se ramifican en la capa plexiforme externa. Estas neuronas presentan un diámetro aproximado de 15-20 μm .

Aunque aparentemente las neuronas retrógradamente marcadas se localizan a lo largo de cualquier subregión del cortex medial (M1-1, M1-2 y M1-3) existe una clara topografía en la localización de somas neuronales marcados tras inyecciones restringidas en el cortex dorsomedial y en el cortex dorsal.

En los ejemplares que presentan una inyección de

HRP restringida al cortex dorsomedial los somas neuronales marcados se localizan fundamentalmente en la porción vertical del cortex medial cuando la inyección se localiza en los niveles medios y caudales y en la porción vertical y dorsal cuando esta se centra en los niveles rostrales (Fig. 3.7 a).

Por otra parte, cuando la inyección de HRP se localiza en el cortex dorsal los somas neuronales marcados se localizan en las porciones dorsal y ventral del estrato de somas del cortex medial. Si la inyección afecta únicamente a los niveles rostrales (D3 rostral) el marcaje retrógrado se localiza fundamentalmente en la porción ventral del estrato de somas; mientras que si afecta a los niveles medios y caudales (D1 y D2) los somas marcados se localizan en la porción dorsal del estrato de somas (Fig. 3.7 b y c).

En lo referente a la distribución de neuronas marcadas a lo largo del eje rostro-caudal del cortex medial también se aprecian diferencias cuando se comparan ejemplares inyectados en las dos regiones corticales estudiadas. Cuando la inyección se efectuó en el cortex dorsal, las neuronas marcadas en el cortex medial se localizaron preferentemente en los niveles de inyección o en los caudales al mismo, mientras que, tras inyecciones en el cortex dorsomedial aquellas se localizaron en los niveles de inyección o en los rostrales (Fig. 3.8).

En algunos ejemplares en los que el enzima fué

inyectado en el cortex dorsomedial se observaron neuronas retrógradamente marcadas en la capa plexiforme interna del cortex medial, estas neuronas presentan un axón ascendente que se ramifica en la capa plexiforme externa del propio cortex medial. No obstante en los casos en los que la inyección se restringió al cortex dorsomedial no se observó la presencia de marcaje en estos tipos neuronales.

3.3.2.- EL CORTEX DORSOMEDIAL

Tanto en los ejemplares en los que el enzima se inyectó en el cortex dorsal como en los que se administró en el cortex dorsomedial se observó constantemente la presencia de neuronas retrógradamente marcadas en el propio cortex dorsomedial tanto en el hemisferio de inyección como en el contralateral (fig. 3.9). Sin embargo, dicho marcaje no fue observado cuando el área de difusión se restringió a la subregión lateral del cortex dorsal tanto en niveles rostrales como caudales.

En el hemisferio contralateral los somas neuronales se localizan exclusivamente en el estrato de somas (Fig. 3.9 a y c), mientras que, en el hemisferio ipsilateral, cuando la inyección afecta únicamente al cortex dorsal las neuronas marcadas se sitúan en el estrato de somas (Fig. 3.9 b) y cuando aquella se centró en el cortex dorsomedial se observaron neuronas marcadas tanto en las dos capas plexiformes como en el estrato de somas, aún

en localizaciones distantes al punto de inyección (Fig. 3.9 d, e y f).

Cuando las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsal las neuronas retrógradamente marcadas en el cortex dorsomedial se localizaron exclusivamente a niveles caudales al punto de inyección tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral (Fig. 3.9 a y b). Por otra parte cuando las inyecciones se centraron en el cortex dorsomedial se observaron neuronas marcadas tanto en los niveles más rostrales como en los más caudales respecto al punto de inyección en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el contralateral estos somas se localizaron fundamentalmente en los niveles próximos al punto de inyección según el eje rostro caudal (Fig. 3.9 c y d).

Las neuronas marcadas en el estrato de somas presentan la misma morfología tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral y tanto tras inyecciones en el cortex dorsomedial como cuando estas se centran en el cortex dorsal. Sus somas presentan una forma redondeada o poligonal de 15 a 20 μm de diametro de los cuales parten dos grupos de dendritas, uno apical y uno basal, que se ramifican profundamente en las capas plexiformes externa e interna y cuyo axón parte del polo basal del soma.

En la capa plexiforme externa se pueden observar dos tipos neuronales marcados uno localizado en la zona Timm negativa y el segundo en la Timm positiva. Las

neuronas localizadas en la zona Timm negativa presentan un soma fusiforme con dos grupos de prolongaciones que parten de ambos polos del cuerpo neuronal y se extienden en dicha zona Timm negativa, adicionalmente, en ocasiones se observa una prolongación que se dirige al estrato de somas (Fig 3.9 f).

Las neuronas localizadas en la zona Timm positiva presentan una morfología redondeada o triangular con dos prolongaciones similares a dendritas que se dirigen hacia la zona Timm negativa y una prolongación basal que se dirige hacia el estrato de somas (Fig. 3.9 e).

En la capa plexiforme interna los tipos neuronales que aparecen marcados presentan una morfología mas variada, adicionalmente, resulta dificultoso diferenciar los tipos neuronales pertenecientes a esta capa del cortex dorsomedial, respecto de los de la misma capa del cortex medial adyacente.

Las neuronas marcadas en la capa plexiforme interna del cortex dorsomedial se localizan preferentemente en los niveles caudales al punto de inyección, siendo en estos niveles en los que esta capa alcanza un mayor grado de organización, así como un mayor volumen y población neuronal.

3.3.3.- EL CORTEX LATERAL

En todos los ejemplares en los que se inyectó HRP

tanto en el cortex dorsomedial como en el cortex dorsal se observó la presencia de somas neuronales marcados en el cortex lateral. Estas neuronas se localizan exclusivamente en la subregión dorsal de la mencionada área cortical (L1) la cual se caracteriza por presentar sus somas neuronales laxamente empaquetados (Fig. 3.10).

Cuando la inyección de HRP se efectúa en el cortex dorsomedial los somas neuronales que presentan producto de reacción se localizan de un modo disperso dentro del cortex lateral (Fig. 3.10 a) y se localizan preferentemente en niveles rostrales al punto de inyección encontrándose neuronas marcadas hasta los niveles en los que el cortex lateral es la única región cortical presente.

Por otra parte, cuando la inyección se efectúa en el cortex dorsal el número de neuronas retrógradamente marcadas en el cortex lateral es muy superior al observado tras inyecciones en dorsomedial. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con inyecciones en el cortex dorsomedial, cuando estas se efectúan en el cortex dorsal el marcaje retrógrado presente en el cortex lateral se puede observar tanto a niveles rostrales como a niveles caudales (Fig. 3.10 b y c).

Sobre la base de su marcaje con HRP se han podido diferenciar dos tipos de somas que envían sus axones al cortex dorsomedial y al cortex dorsal: neuronas bipolares o fusiformes y neuronas triangulares o globulares; estos tipos neuronales aparecen aproximadamente con la misma

frecuencia.

Las neuronas triangulares y las globulares se localizan en el seno del estrato de somas, presentan tres ramificaciones dendríticas que parten de los vértices del soma neuronal de un modo radial y en ocasiones se puede observar la salida de una prolongación similar a un axón que presenta una trayectoria ascendente (Fig. 3.11 a).

Las neuronas fusiformes se orientan con su eje mayor paralelo a la membrana glial, son neuronas superficiales que generalmente se presentan aisladas en las porciones superficiales y externas de la subregión L1. Normalmente presentan dos ramas dendríticas que parten de los dos polos del soma y en ocasiones se observa la salida de un axón ascendente que se pierde en la proximidad del cuerpo neuronal (Fig. 3.11 b).

Tanto en inyecciones en el cortex dorsal como en el dorsomedial, se pueden observar en el cortex lateral gran número de axones marcados, los cuales se pueden diferenciar en dos grupos: un primer grupo, entra en el cortex lateral por la porción más superficial de la capa plexiforme externa incurvándose a distintos niveles de la subregión L1 y un segundo tipo de axones llegan a esta región cortical a través de la superpositio lateralis, estos axones penetran en el estrato granular contorneando, en algunos casos los glomerulos de los somas neuronales de la subregión ventral (L2), incurvándose posteriormente hacia la cresta ventricular dorsal, a través de la cual presentan una

trayectoria en dirección ventral.

Cuando se inyectó HRP en el cortex lateral se observó un marcaje de eferencias sobre las áreas paleales dorsomedial y dorsal, este marcaje es mucho más prominente sobre esta última área que sobre la primera. En los niveles en los que aún no aparece el cortex dorsomedial, la banda de eferencias del cortex lateral cubre la porción mas externa de todas las áreas corticales, a niveles medios esta banda se separa en dos, una sobre el cortex medial y otra sobre el cortex dorsal, quedando el cortex dorsomedial aparentemente libre de marcaje, sin embargo en la porción mas externa de su capa plexiforme externa se pueden observar axones que presentan engrosamientos periódicos (Fig. 3.11 c); este tipo de marcaje sobre el cortex dorsomedial se puede observar incluso en los niveles más caudales.

La banda de eferencia sobre el cortex dorsal se va haciendo progresivamente más lateral hacia niveles caudales abarcando únicamente las subregiones D2 y D3 tanto a niveles rostrales como caudales ocupando la porción más superficial (Fig. 3.12 a y b).

3.3.4.- ESTRUCTURAS DEL TELEENCEFALO BASAL

Tres estructuras aparecen con somas neuronales marcados en posiciones ventrales respecto a los núcleos septales y en posiciones mediales respecto a los núcleos

del estriado ventral a niveles del telencéfalo caudal: el núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial (bnMFB), el núcleo del lecho de la comisura anterior (bnCA) y la porción vertical del núcleo de la banda diagonal. Este patrón de marcaje no se observa en todos los ejemplares inyectados, tanto en el cortex dorsal, como en el dorsomedial, adicionalmente el número de neuronas marcadas en cada caso es muy inferior, en proporción al que presentan otros núcleos o estructuras, sin embargo, se han observado neuronas marcadas en estas localizaciones en algunos casos en los cuales la inyección se restringió exclusivamente a las áreas objeto de estudio.

En el bnMFB las neuronas retrógradamente marcadas representan un escaso porcentaje respecto al total de neuronas que conforman este núcleo, aparecen constantemente tras inyecciones en el cortex dorsal y en menor proporción cuando estas se centran en el cortex dorsomedial, aunque en alguno de estos casos la difusión no llegó al cortex dorsal. Sus cuerpos neuronales presentan una morfología alargada triangular o fusiforme con su eje mayor paralelo a la fisura interhemisférica, aunque en algunos casos adoptan una posición oblicua respecto a esta línea de referencia (Fig. 3.13 a, b y c).

En lo que respecta al tracto que puede dar lugar a esta proyección, es difícil observar la salida de los axones marcados desde el soma neuronal, de cualquier modo, es preciso señalar que a través de este núcleo cruzan

numerosas fibras marcadas que constituyen el llamado fascículo prosencefálico medial, por otra parte del extremo caudal de este núcleo se ha podido observar la presencia de axones que se integran en el tracto cortico-habenular anterior (Fig. 3.13 d)

También en muchos ejemplares tanto con inyección en el cortex dorsomedial como en el cortex dorsal se observaron somas neuronales marcados en la porción vertical del núcleo de la banda diagonal, aunque el número de neuronas marcadas cuando la inyección se centra en el cortex dorsomedial es muy inferior al observado cuando esta se centra en el cortex dorsal. Los somas neuronales se sitúan fundamentalmente en la porción dorsal del núcleo y presentan una morfología fusiforme con el eje mayor paralelo a la fisura interhemisférica (Fig. 3.13 c).

Las neuronas marcadas del núcleo del lecho de la comisura anterior se localizan ventralmente respecto a la mencionada comisura y presentan una morfología fusiforme alargada con su eje mayor paralelo respecto a las fibras suprayacentes en cortes transversales, mientras que en cortes longitudinales presentan un aspecto granular. Al igual que ocurre con las neuronas del núcleo accumbens estas neuronas aparecen constantemente marcadas tras inyecciones en el cortex dorsal y con menor frecuencia cuando estas se centran en el cortex dorsomedial, sin embargo, el número de somas marcados en esta localización es muy escaso (Fig. 3.14).

3.3.5.- LA PROYECCION TALAMICA

La única estructura talámica en la cual se observaron somas neuronales retrógradamente marcados tanto en inyecciones en el cortex dorsomedial como en inyecciones en el cortex dorsal fué el núcleo dorsolateral anterior. En este núcleo las neuronas marcadas se presentan tanto ipsi como contralateralmente. Sin embargo el número de somas marcados contralateralmente es siempre muy inferior al del tálamo ipsilateral. Del mismo modo, cuando la inyección se restringió al cortex dorsomedial el número de neuronas marcadas fué siempre muy inferior al marcaje obtenido en este núcleo cuando la inyección afectó al cortex medial o al cortex dorsal.

En el núcleo dorsolateral anterior se pueden diferenciar dos subregiones atendiendo al tamaño de sus somas neuronales y al empaquetamiento de los mismos: la "pars magnocellularis" y la "pars parvocellularis". La primera, cuyos somas presentan un tamaño relativamente mayor y una distribución más laxa se localiza en las porciones ventrales y caudales del núcleo; mientras que la pars parvocellularis presenta somas pequeños con un mayor empaquetamiento que se localizan en las porciones dorsales y rostrales.

Cuando la inyección se efectuó en el cortex dorsomedial con difusión al cortex medial las neuronas que

aparecen retrógradamente marcadas se localizan preferentemente en la pars parvocellularis siendo muy escasas las localizadas en la magnocellularis (Fig. 3.16 a).

Por otro lado, las inyecciones en las distintas subregiones del cortex dorsal mostraron un marcaje retrógrado localizado en la pars magnocellularis (Fig. 3.16 b).

Dos tipos neuronales aparecen con producto de reacción en el interior de su soma: alargadas grandes y granulares pequeñas. Las neuronas alargadas grandes se localizan exclusivamente en la pars magnocellularis, presentan un soma neuronal fusiforme o triangular, del cuerpo neuronal parten 3 o 5 prolongaciones dendríticas de un modo radial que se bifurcan en ángulos muy abiertos (Fig. 3.16 c). Las neuronas granulares pequeñas presentan asimismo un cuerpo neuronal redondeado o triangular del cual parten 2 o 3 prolongaciones dendríticas y se localizan tanto en la pars magnocellularis como en la parvocellularis (fig. 3.16 d).

En los casos en los cuales es posible observar la salida del axón, este parte del polo ventral del soma en los dos tipos neuronales observados. Los axones que parten desde los distintos puntos del nucleo dorsolateral anterior se reunen en el extremo ventro lateral del nucleo dando lugar al pedúnculo dorsal del fascículo prosencefálico lateral (LFB) (Fig. 3.17 d). Desde esta localización los

axones marcados presentan una trayectoria en sentido ventrolateral hasta integrarse con el resto de fibras del LFB en el límite dorsal del hipotálamo donde se incurvan adquiriendo una trayectoria longitudinal hasta llegar a los niveles en los cuales aparece la comisura anterior (Fig. 3.17 c). A este nivel las neuronas procedentes del tálamo contralateral se integran en la comisura anterior alcanzando de este modo el hemisferio ipsilateral donde se incurvan tomando de nuevo una trayectoria en sentido dorsal ascendiendo hacia la corteza cerebral por una vía medial a través del septum o por una vía lateral a través de la cresta ventricular dorsal (Fig. 3.17 c).

Las fibras que llegan hasta los niveles de la comisura anterior procedentes del tálamo ipsilateral se dividen en dos grupos antes de ascender a la corteza cerebral, las fibras de uno de ellos llega al palio mediante una ruta medial mientras que la otra lo hace mediante una ruta lateral (Fig. 3.17 b). Las primeras atraviesan la comisura anterior transversalmente hasta alcanzar el septum caudal donde se unen a las contralaterales, algunas de estas fibras presentan un grueso calibre lo que facilita su seguimiento incluso dentro de la corteza cerebral, desde el septum estos axones se dirigen hacia niveles mas rostrales y dorsales hasta llegar al alveus cortical desde donde algunas se dirigen al cortex dorsomedial, mientras que otras se localizan en la capa plexiforme externa del cortex medial perdiendose entre

las bandas de eferencias. Las que llegan al nivel del cortex dorsomedial atraviesan la capa plexiforme interna hasta llegar al estrato de somas donde se incurvan ligeramente para atravesar la zona Timm positiva de la capa plexiforme externa llegando a la Timm negativa donde se vuelven a incurvar tomando una trayectoria paralela a la membrana glial en sentido lateral dirigiendose al cortex dorsal (Fig. 3.17 a).

Las fibras que siguen una trayectoria lateral continuan en el LFB hasta niveles precomisurales donde toman una ruta ascendente a través de la cresta ventricular dorsal (DVR) atravesandolo hasta llegar al sulcus lateralis del endimo donde algunas de estas fibras bordean algunos cuerpos neuronales de la subregión ventral del cortex lateral (L1) pasando posteriormente a través de la superpositio lateralis hasta llegar al cortex dorsomedial o al cortex medial según los casos (Fig. 3.17 a).

Todas las rutas de proyecciones descritas se presentan tanto en los casos en los que las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsomedial, como en aquellos en los que el enzima se administró en el cortex dorsal.

3.3.6.- LOS CUERPOS MAMILARES

En todos los ejemplares en los que se inyectó HRP en el cortex dorsomedial o en las subregiones medial e intermedia (D1 y D2) del cortex dorsal se observaron somas

neuronales marcados en los cuerpos mamilares del hipotálamo caudal.

En los cuerpos mamilares se pueden distinguir citoarquitectónicamente y en función de su modelo de conexiones dos núcleos: el núcleo mamilar medial y el lateral; el primero de localización ventrocaudal rodea el receso infundibular hipofisario, mientras que el segundo ocupa una posición más lateral y dorsal, justo por debajo de la decusación supramamilar. De ellos únicamente el núcleo mamilar lateral presentó marcaje retrógrado en las distintas inyecciones de HRP practicadas (Fig. 3.18). Adicionalmente, también se ha considerado como perteneciente a la formación mamilar un núcleo par, que se localiza justo por encima de la decusación supramamilar y que en lo sucesivo será referido como núcleo supramamilar. Dicho núcleo presenta también marcaje retrógrado pero bilateral (Fig. 3.18).

En el núcleo mamilar lateral los somas neuronales retrógradamente marcados presentan una morfología fusiforme con dos troncos dendríticos principales que salen de ambos polos del cuerpo neuronal y están orientadas de forma que su eje mayor es paralelo a las fibras que forman la decusación supramamilar.

Las neuronas marcadas en el núcleo supramamilar presentan una morfología similar a las del mamilar lateral, aunque el contorno de su soma es más redondeado y en ocasiones es posible observar la salida de un penacho de

dos o tres dendritas desde el polo lateral del cuerpo neuronal; también en este caso las neuronas se orientan con su eje mayor paralelo a las fibras que componen la decusación supramamilar.

Es necesario señalar que el número de neuronas marcadas en el núcleo mamilar lateral fué en todos los casos muy superior al marcaje en el núcleo supramamilar.

En ningún caso se pudieron seguir directamente los axones procedentes de los cuerpos mamilares desde su salida del cuerpo neuronal, sin embargo, si que fué posible el trazado de dos tractos de fibras marcadas que desde los cuerpos mamilares alcanzan la corteza cerebral llegando hasta los respectivos puntos de inyección: el primero de ellos es el fascículo prosencefálico medial (MFB), integrado fundamentalmente por axones de grueso calibre entre los cuales se encuentran también axones de menor diámetro; el segundo esta formado por fibras que alcanzan la corteza cerebral a través del fornix postcomisural.

Los axones que se integran en el fornix postcomisural presentan, al igual que las del MFB, un grueso calibre por lo que en algunos casos fué posible su seguimiento hasta el punto de inyección. Estas fibras presentan una trayectoria inicial entre los cuerpos neuronales (Fig. 3.19 d) para ascender posteriormente hasta el núcleo periventricular del hipotálamo donde se localizan en primer lugar entre los cuerpos de las neuronas para situarse posteriormente en el margen lateral del citado

núcleo ascendiendo hasta llegar al área dorsal hipotalámica (Fig 3.19 b y c), ingresan en el fornix postcomisural hasta alcanzar el área proóptica medial a niveles comisurales cruzando las comisuras e ingresando en el telencéfalo por detrás de las mismas (Fig. 3.19 a). En esta localización los axones toman una trayectoria en sentido caudo-rostral cruzando la formación septal e ingresando en el alveus del cortex medial. A este nivel se han podido observar axones que decusan medialmente ingresando en la capa plexiforme externa de la citada región cortical por donde ascienden en sentido rostro-caudal hasta alcanzar el cortex dorsomedial en primer lugar y el cortex dorsal posteriormente (Fig. 3.19 b).

Las fibras del MFB ascienden desde los cuerpos mamilares hasta el límite dorsal del hipotálamo donde se sitúan mediálmente respecto a las que constituyen el LFB y posteriormente toman una trayectoria caudo-rostral ingresando en el telencéfalo a niveles postcomisurales. La trayectoria de estas fibras será descrito con mayor detalle en el apartado siguiente correspondiente al núcleo del rafe (apartado 3.2.7).

Por último, es de destacar que tan sólo cuando las inyecciones afectaron a las subregiones medial e intermedia del cortex dorsal fué posible observar neuronas marcadas en los cuerpos mamilares, no observandose tal marcaje en los casos de inyecciones restringidas a la subregión lateral

del cortex dorsal o en inyecciones en el cortex lateral con difusión al cortex dorsal.

3.3.7.- EL NUCLEO DEL RAPE

En todos los ejemplares en los que se inyectó HRP en las áreas corticales dorsomedial y dorsal se encontraron somas neuronales marcados en el núcleo del rafe superior. Dicho núcleo se localiza en el tronco del encéfalo en el límite rostral del romboencéfalo.

En Gallotia stehlinii el núcleo del rafe esta formado por dos líneas de células centrales y algunas neuronas alrededor de las dos líneas centrales. En este núcleo las neuronas marcadas se sitúan fundamentalmente en la línea contralateral respecto al hemisferio de inyección aunque también se han observado somas con producto de reacción en la línea ipsilateral y en la región periférica del núcleo (Fig. 3.20 a).

En Podarcis hispanica, en cambio, el núcleo esta formado por una masa central impar y algunas neuronas dispersas alrededor de la misma. En este caso, las neuronas marcadas se localizan mayoritariamente en la masa central y en menor medida en la periferia (Fig. 3.20 b).

Dos tipos neuronales aparecen marcados en este núcleo: uno de gran tamaño que se localiza siempre en la masa central y otro más pequeño que se puede presentar en cualquiera de las subdivisiones anteriormente establecidas.

Las neuronas grandes presentan un cuerpo neuronal entre fusiforme y globular que en la mayor parte de los casos se orienta con su eje mayor perpendicular a la línea media de esta formación; del cuerpo neuronal parten dos grupos de prolongaciones que salen de los dos polos de la célula uno se dirige hacia la formación ipsilateral y otro hacia la contralateral, de este último grupo se pueden distinguir dos tipos de prolongaciones, unas son dendritas que se bifurcan en ángulos agudos, y otra es el axón (Fig. 3.20 b).

El otro tipo neuronal es de menor tamaño aunque mucho más frecuente que el anterior y puede presentarse en distintas formas tales como fusiformes, triangulares o granulares no tiene una orientación definida en el núcleo y puede presentar dos o tres prolongaciones de las cuales una es el axón.

El axón de las neuronas localizadas contralateralmente parte lateralmente dirigiéndose hacia el borde inferior del tronco cerebral, aunque los tramos iniciales de algunos axones sea ascendente (Fig. 3.21 e). Por otra parte, de las neuronas que se localizan ipsilateralmente el axón parte medialmente y cruza la línea media para reunirse en el tronco cerebral contralateral con los axones procedentes de las neuronas contralaterales.

Los axones procedentes del núcleo del rafe se sitúan en la base del tronco cerebral bordeando lateralmente los núcleos intrapedunculares donde toman una

trayectoria en sentido rostral, por lo que en cortes transversales las fibras marcadas a estos niveles presentan una longitud muy corta, casi puntual. A niveles más rostrales las fibras rodean la salida de los axones que constituyen la salida del tercer par craneal hasta alcanzar la decusación supramamilar por donde pasan al hipotálamo ipsilateral donde ingresan en el fascículo prosencefálico medial (MFB) (Fig. 3.20 c y Fig. 3.21 d). Las fibras que integran el MFB, entre las que se encuentran algunas de grueso calibre, ascienden a través del hipotálamo hasta alcanzar los niveles comisurales (Fig. 3.21 a y b).

La mayor parte de axones procedentes del núcleo del rafe ingresan en la corteza cerebral por niveles caudales atravesando la comisura paleal posterior, aunque sin integrarse en la misma (Fig. 3.21 a). Algunas de estas fibras ingresan directamente en el alveus del cortex medial desde donde atraviesan la capa plexiforme interna y el estrato de somas hasta llegar a la capa plexiforme externa. Otras, en cambio, pasan directamente a la capa plexiforme externa del cortex medial, la mayor parte de estos axones presentan un grueso calibre y emiten colaterales axónicas que acaban en el estrato de somas de esta región cortical (Fig 3.21 a). Posteriormente los axones ascienden hasta alcanzar el cortex dorsomedial y el cortex dorsal.

La mayor parte de axones procedentes del núcleo del rafe recorren el tramo del tronco cerebral por el lado contralateral al de inyección pasando al ipsilateral por la

decusación supramamilar, sin embargo, también se han observado algunos axones que acaban en el núcleo del rafe y que recorren el tronco cerebral por el lado ipsilateral a la inyección.

En algunos ejemplares, los axones marcados procedentes del núcleo del rafe presentan a lo largo de toda su trayectoria hasta la corteza cerebral engrosamientos periódicos muy prominentes.

Fig. 3.5.- Esquema que representa las aferencias telencefálicas a las áreas corticales dorsomedial y dorsal. a) en vista dorsal b, c y d) en cortes transversales. En el hemisferio derecho se han representado las aferencias desde el cortex medial, porción vertical del núcleo de la banda diagonal, núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial y núcleo del lecho de la comisura anterior; y en el hemisferio izquierdo la aferencia desde el cortex lateral. Abreviaturas: bCA, núcleo del lecho de la comisura anterior; bMFB, núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; vDB, porción vertical del núcleo de la banda diagonal

FIGURA 3.5

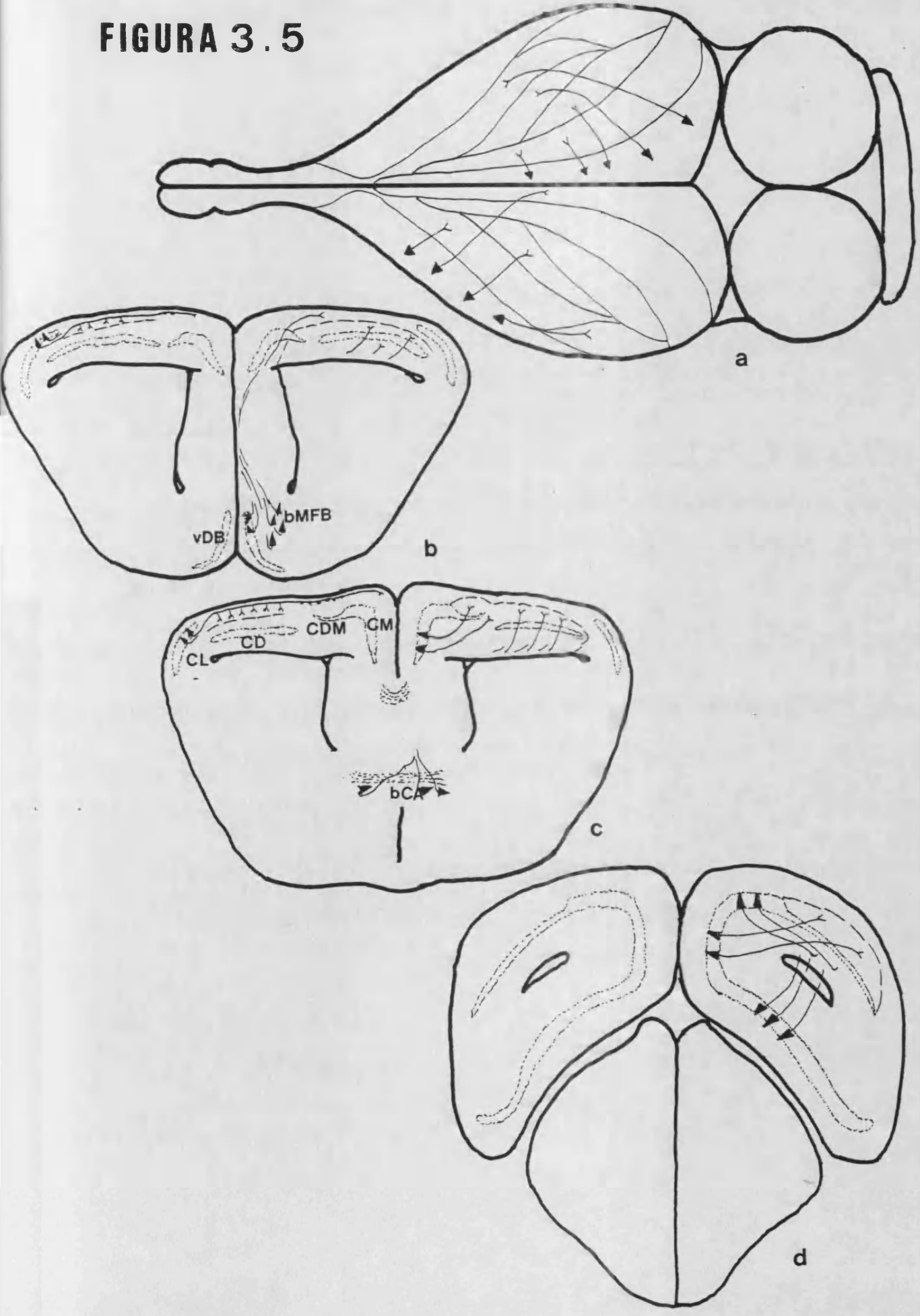


Fig. 3.6.- Somas neuronales retrógradamente marcados en el estrato de somas del cortex medial. En Gallotia stehlinii ejemplar 853

a) neurona granular pequeña. Barra de referencia 20 um

b) neurona triangular grande. Barra de referencia 20 um

c) neurona fusiforme superficial. Barra de referencia 20 um

d) neurona triangular superficial. Barra de referencia 20 um

Abreviaturas: es, estrato de somas; pl ex, capa plexiforme externa; pl in, capa plexiforme interna

FIGURA 3.6

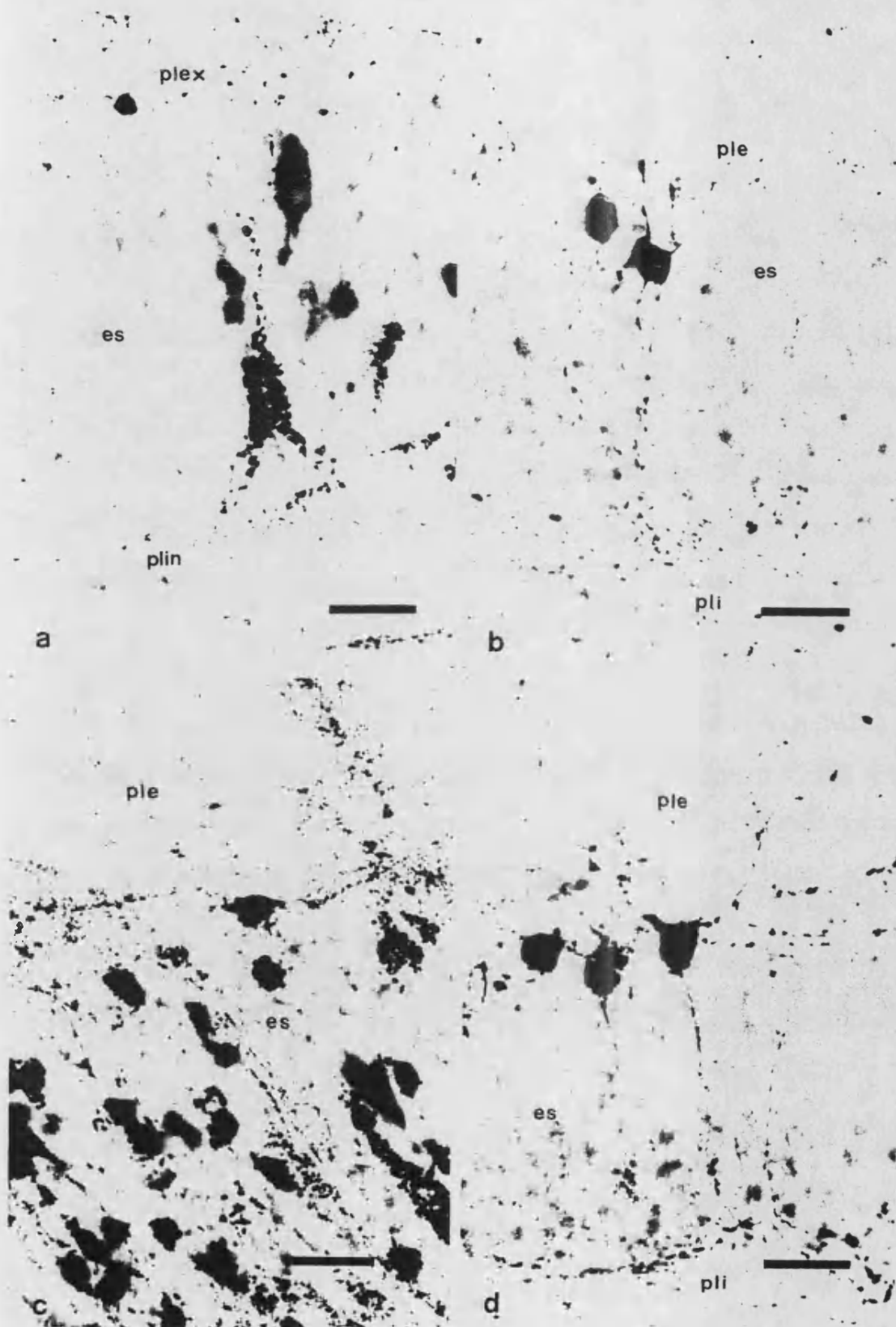


Fig. 3.7.- Topografía de aferencias del cortex medial sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal.

a) inyección en el cortex dorsomedial en Gallotia stehlinii. Observese la localización de los somas neuronales marcados en la porción vertical del estrato de somas. Barra de referencia 300 um.

b) inyección en el cortex dorsal a nivel caudal en Podarcis hispanica. En este caso el marcaje retrógrado se localiza en la porción dorsal. Barra de referencia 100 um.

c) inyección en el cortex dorsal a nivel rostral en Podarcis hispanica. En este caso las neuronas marcadas retrógradamente se localizan en las porciones dorsal y ventral del estrato de somas. Barra de referencia 300 um.

Las flechas señalan la localización de los somas neuronales marcados retrógradamente, mientras que el asterisco señala eferencias desde el lugar de inyección correspondiente

FIGURA 3.7



a

b

c

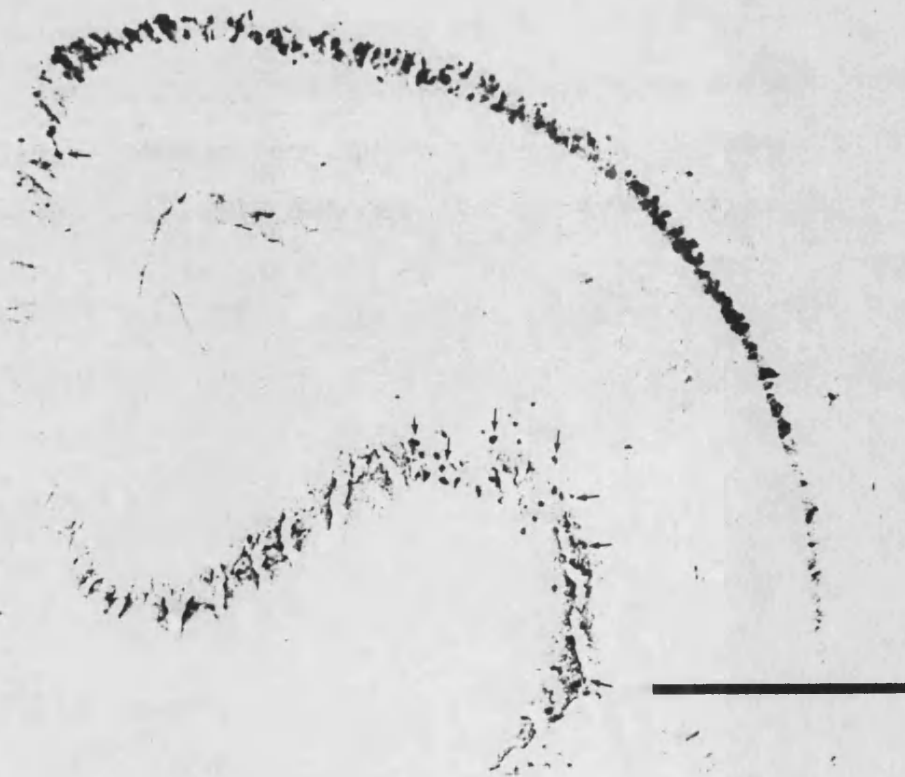


Fig. 3.8.- Dibujos con cámara clara en los que se representa la localización de las neuronas retrógradamente marcadas en el estrato de somas del cortex medial tras inyecciones en: a) cortex dorsomedial (ejemplar 847 Gallotia stehlini) presentandose la inyección en el tercer nivel, b) cortex dorsomedial (ejemplar 1371 Podarcis hispanica) presentandose la inyección en el tercer nivel, c) cortex dorsal (ejemplar 928 Podarcis hispanica) presentandose la inyección en el primer nivel. Observese que el marcaje retrógrado se localiza en los niveles próximos al punto de inyección cuando esta se centra en el cortex dorsomedial mientras que las inyecciones en el cortex dorsal dan lugar a marcaje masivo en los niveles caudales.

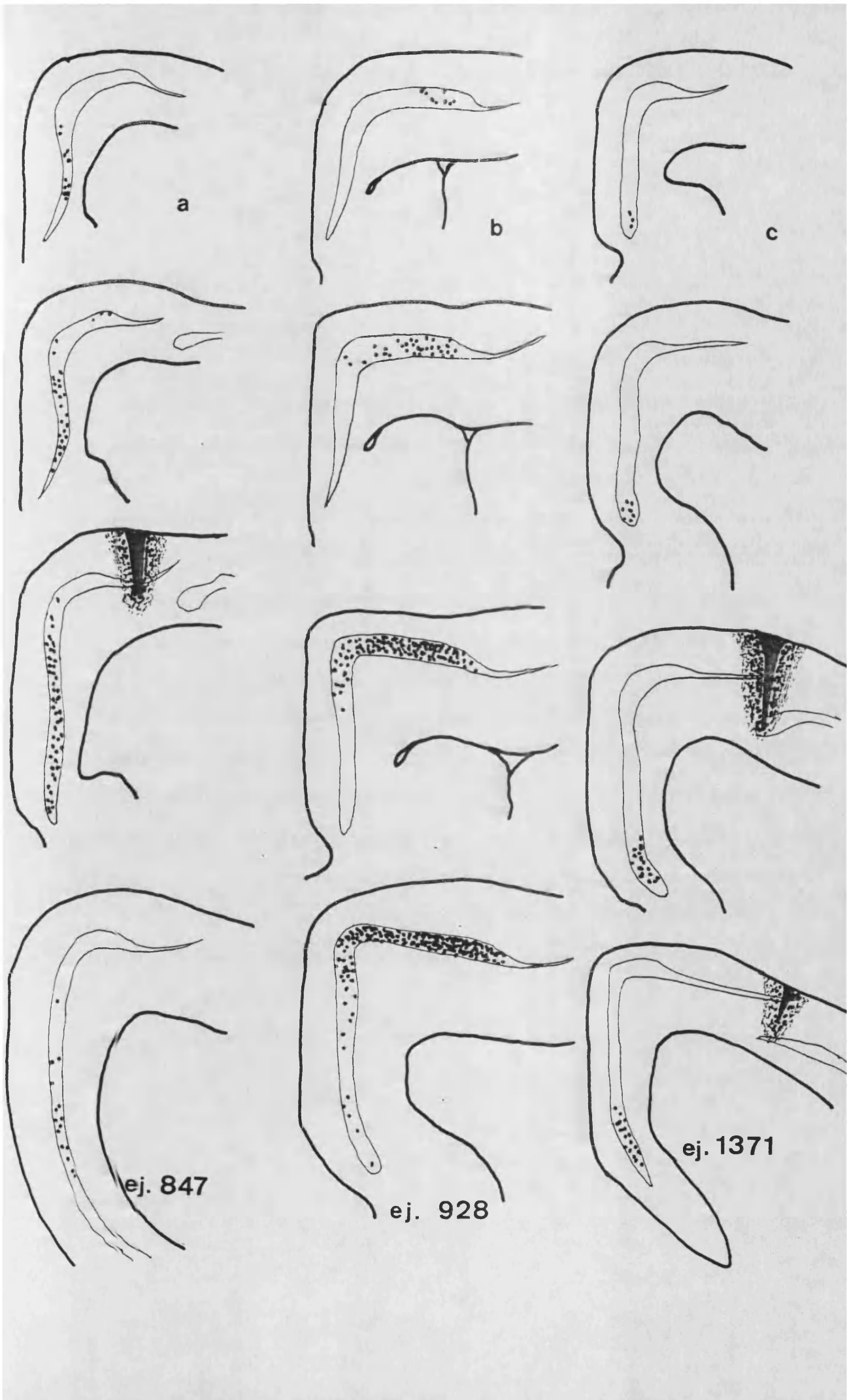


Fig. 3.9.- Microfotografías que muestran el marcaje retrógrado en el cortex dorsomedial tras inyecciones en el cortex dorsal y en el cortex dorsomedial

a) marcaje retrógrado (↑) en el estrato de somas del cortex dorsomedial contralateral tras inyección en el cortex dorsal. Barra de referencia 100 um

b) el mismo caso que en -a- pero en el hemisferio ipsilateral. Barra de referencia 100 um

c) marcaje retrógrado (↑) en el estrato de somas del cortex dorsomedial contralateral tras inyección en el propio cortex dorsomedial. Barra de referencia 200 um

d) marcaje retrógrado en el estrato de somas (↑) y en la capa plexiforme interna (▲) del cortex dorsomedial ipsilateral tras inyección en el propio cortex dorsomedial. Barra de referencia 200 um

e) neurona marcada en la zona Timm positiva de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial ipsilateral tras inyección en esta misma región. Barra de referencia 30 um

f) neurona marcada en la localización señalada en el recuadro de -e- entre las zonas Timm positiva y Timm negativa. Barra de referencia 30 um

FIGURA 3.9

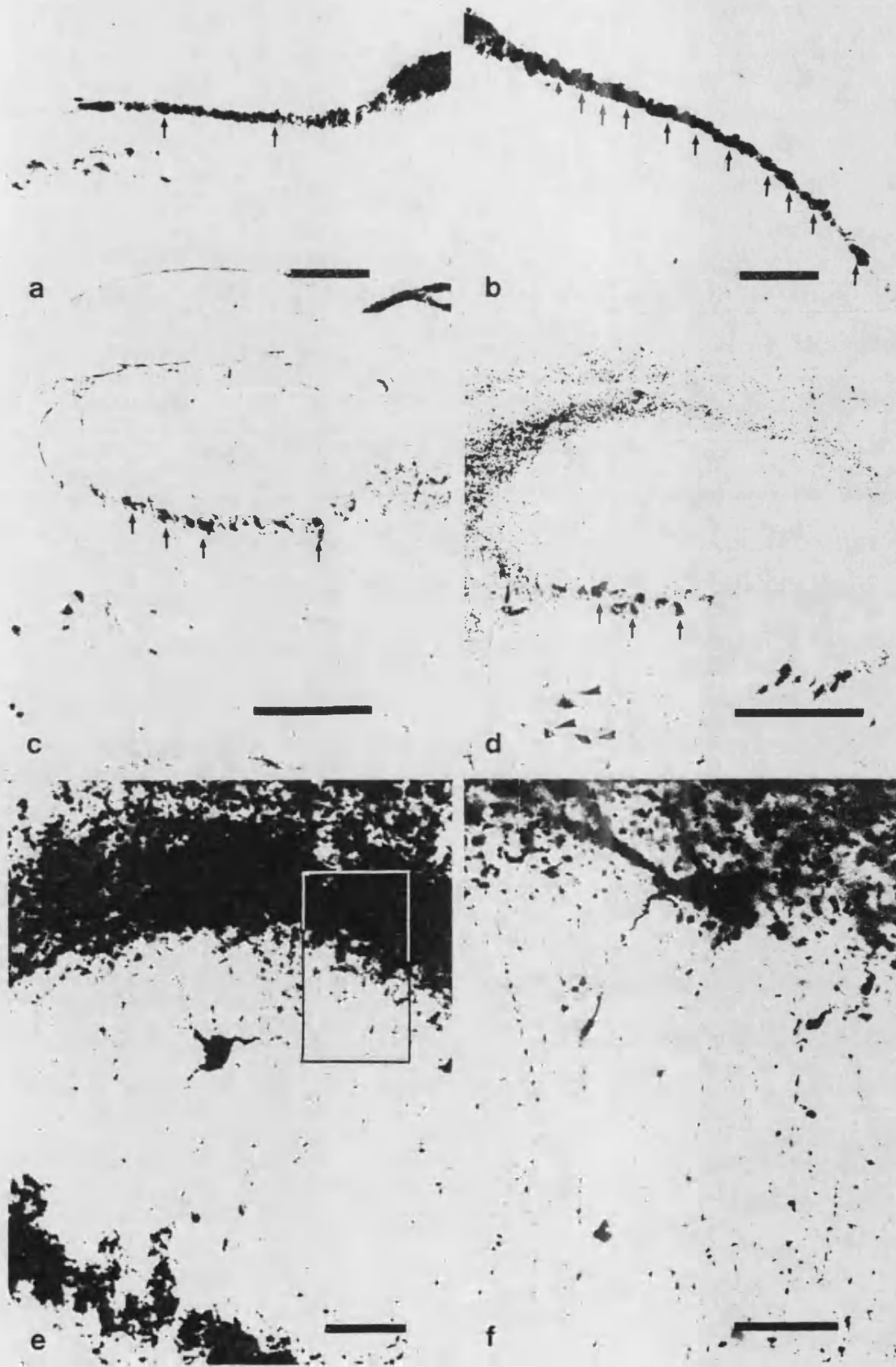


Fig. 3.10.- Microfotografías que muestran el marcaje retrógrado en el cortex lateral.

a) inyección en el cortex dorsomedial en Gallotia stehlinii; observese la clara subdivisión del cortex lateral en una subregión dorsal (L1) de empaquetamiento celular laxo y una subregión ventral (L2) de empaquetamiento denso. Los somas neuronales marcados (†) se localizan exclusivamente en la subregión dorsal. Barra de referencia 200 um

b) inyección en el cortex dorsal en Podarcis hispanica; en esta microfotografía se muestra un nivel relativamente rostral del cortex lateral en el que la subregión L2 aparece libre de marcaje retrógrado. Barra de referencia 100 um

c) inyección en el cortex dorsal en Podarcis hispanica; en esta microfotografía se muestra un nivel relativamente caudal del cortex lateral en el que ya no aparece la subregión L2. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.10

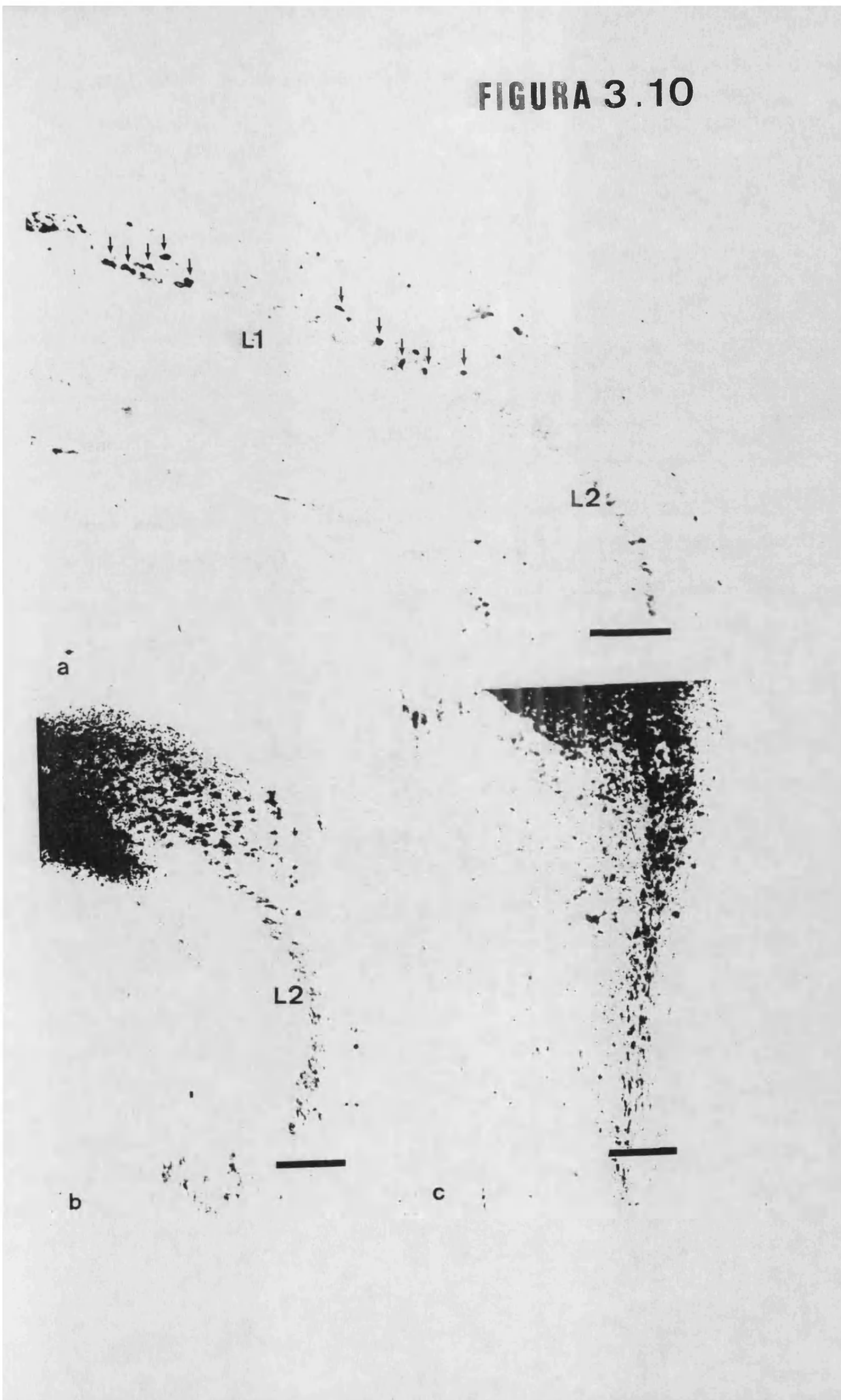


Fig. 3.11.- Microfotografías de somas neuronales y axones marcados con HRP.

a) neuronas triangular (a) y globular (b) marcadas en la subregión L1 del cortex lateral tras inyección en el cortex dorsomedial. Barra de referencia 50 um

b) neurona fusiforme localizada encima de la subregión L2 tras inyección en el cortex dorsomedial. Barra de referencia 50 um

c) marcaje anterógrado de axones en el cortex dorsomedial tras inyección en el cortex lateral; observese que algunos de estos axones presentan engrosamientos periódicos (flechas). Barra de referencia 50 um

FIGURA 3.11

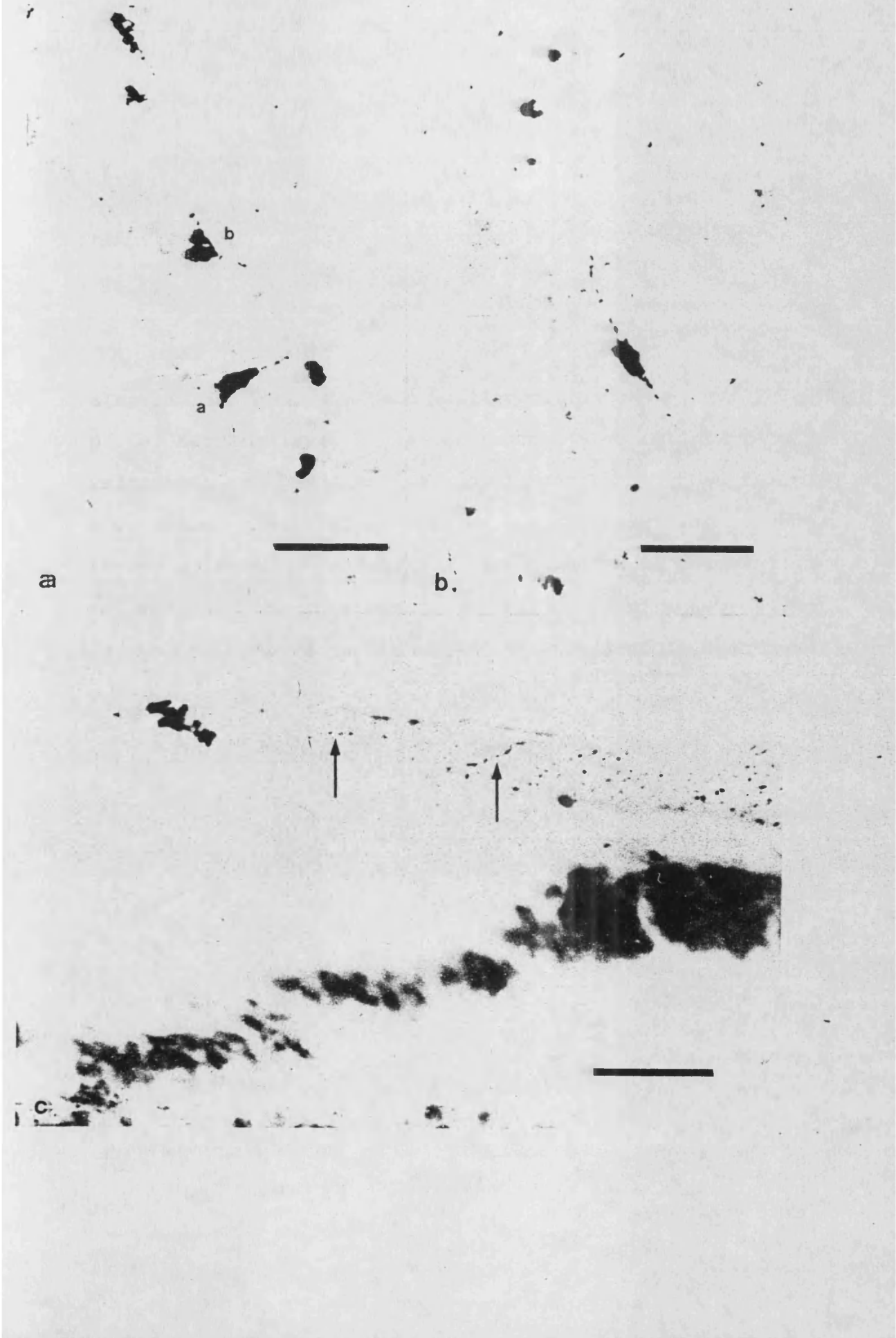


Fig. 3. 12.- Microfotografías que muestran el marcaje anterógrado (★) en el cortex dorsal, a nivel rostral (a) y a nivel caudal (b) tras inyección de HRP en el cortex lateral. Observese que el marcaje anterógrado ocupa una mayor extensión de la capa plexiforme externa a nivel rostral que a nivel caudal, no apareciendo tal marcaje en la subregión D1. Barras de referencia en a) 100 um en b) 100 um

FIGURA 3.12

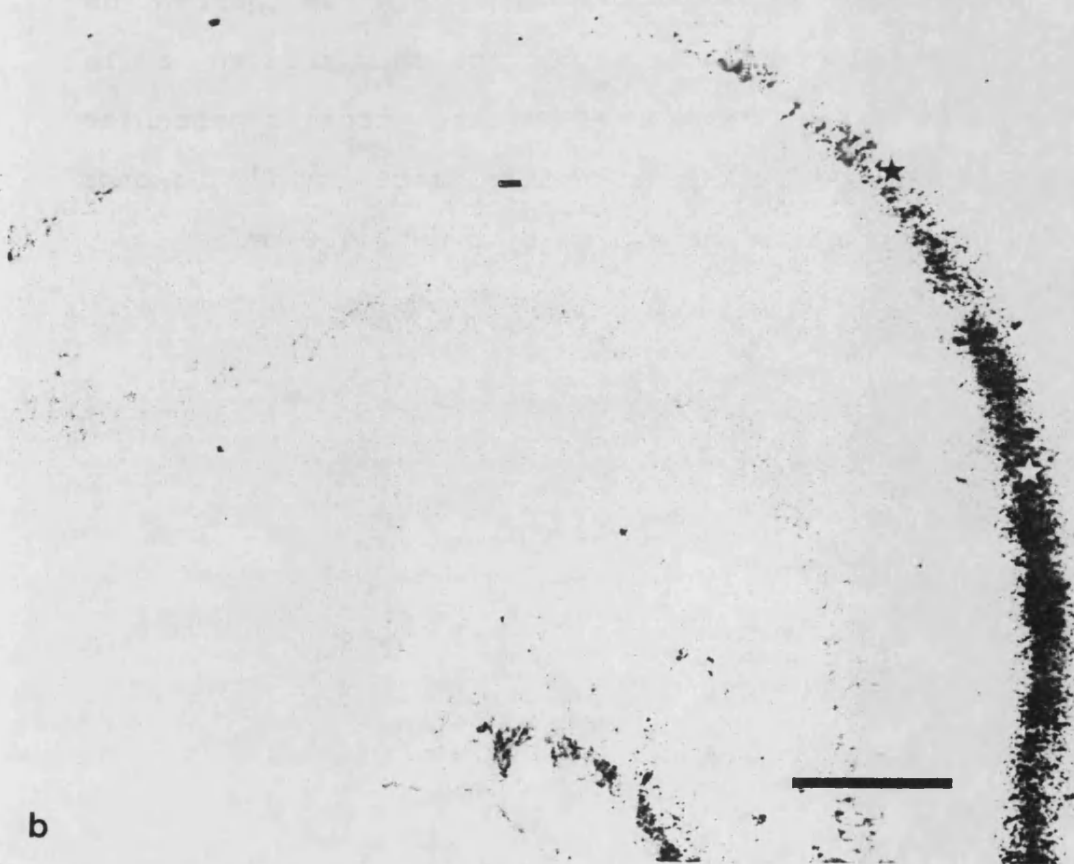
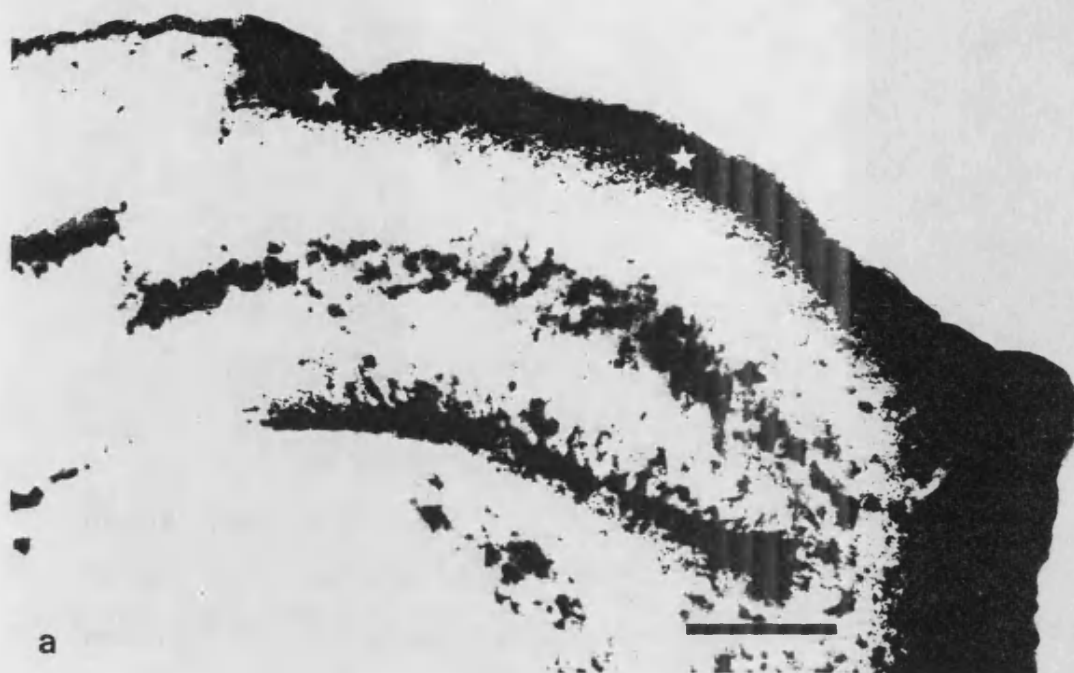


Fig. 3.13.- Dibujo con cámara clara (a) y microfotografías (b, c, d) que muestran el marcaje retrógrado en el núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial (bMFB) y en la porción vertical del núcleo de la banda diagonal (vDB). En -d- se representan además algunos axones que parten de estos núcleos telencefálicos subcorticales y acceden a la corteza cerebral a través del tracto cortico-habenular anterior (tcha). (▲) somas neuronales marcados, (↑) axones marcados. Barras de referencia: en b, c y d) 100 um

FIGURA 3.13

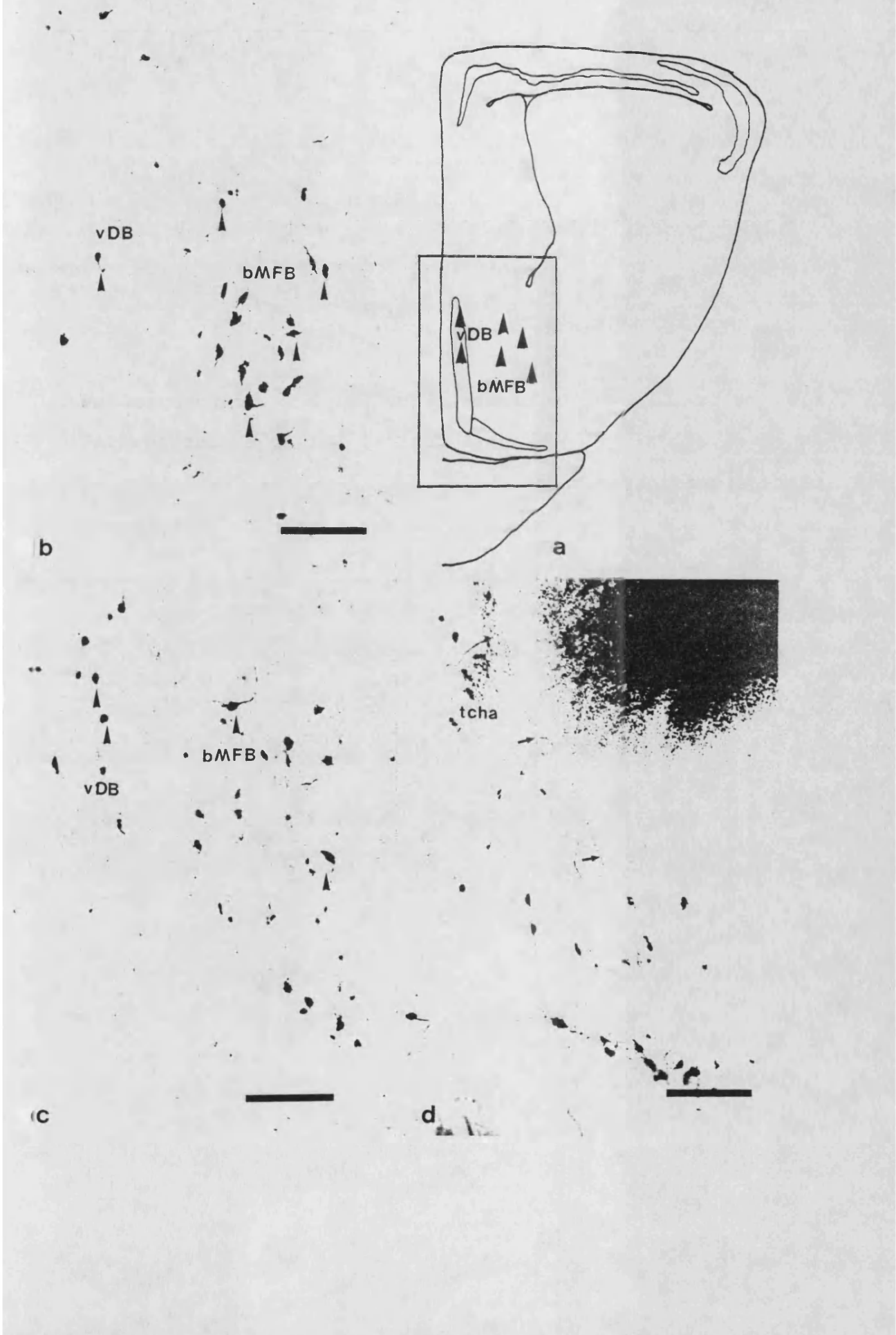


Fig. 3.14.- Dibujo con cámara clara (a) y microfotografías (a nivel caudal (b) y a nivel rostral (c)) que muestran el marcaje retrógrado en el núcleo del lecho de la comisura anterior (bCA). Observese que los somas neuronales marcados se localizan bilateralmente.

(▲) neuronas marcadas, (↑) axones marcados

Barras de referencia en b) y c) 100 um

FIGURA 3. 14

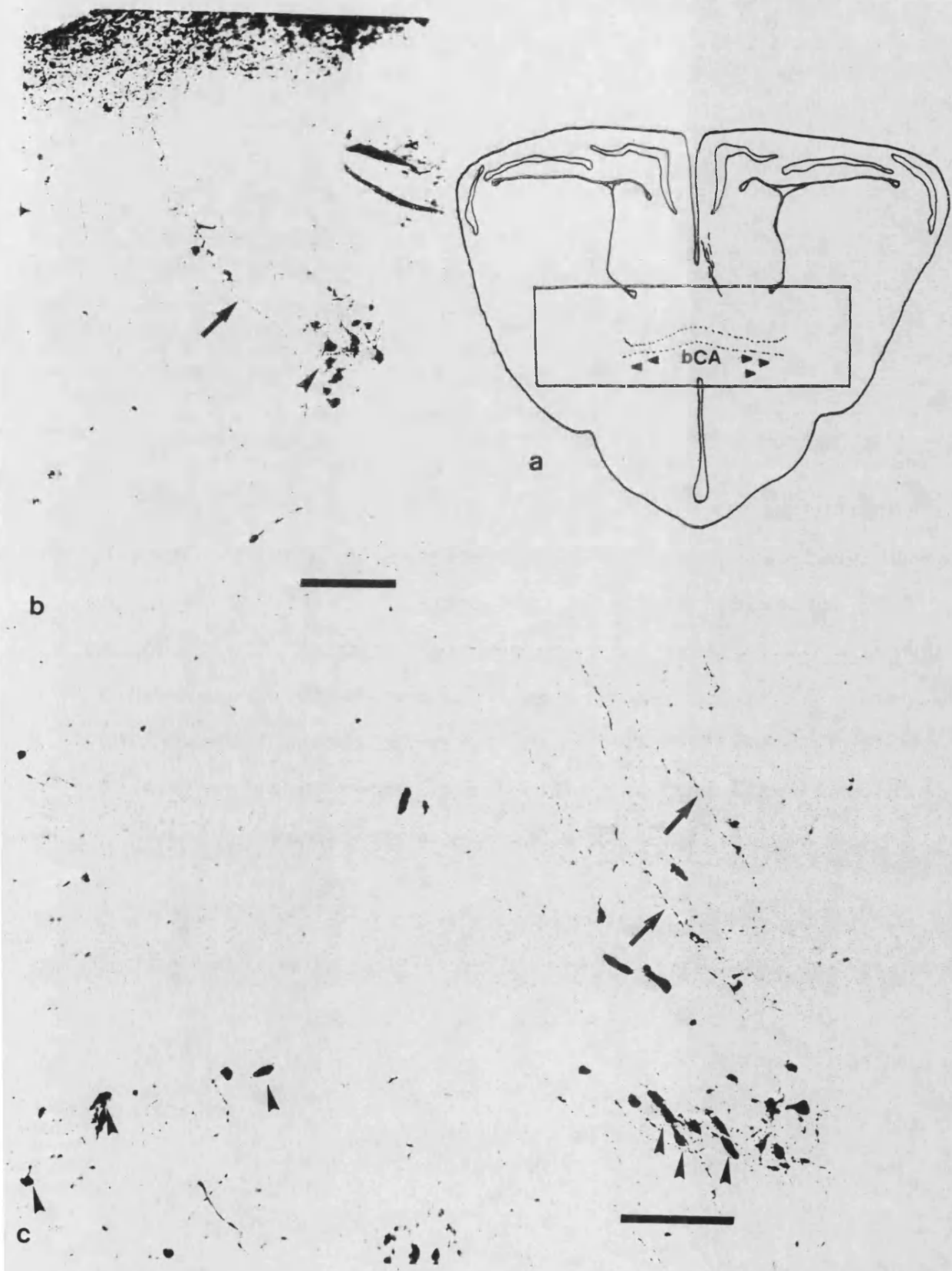


Fig. 3.15.- Esquema en el que se representan las aferencias extratelencefálicas a las áreas corticales dorsomedial y dorsal y sus respectivas vías de proyección en corte longitudinal (a) y en cortes transversales (b-f).

Abreviaturas: ca, comisura anterior; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial, CL, cortex lateral; CM, cortex medial; cpa, comisura paleal anterior; DLA, núcleo dorsolateral anterior del tálamo; ds, decusación supramilar; lfb, fascículo prosencefálico lateral; MB, cuerpos mamilares; mfb, fascículo prosencefálico medial; NR, núcleo del rafe; fxpo, fornix postcomisural

FIGURA 3.15

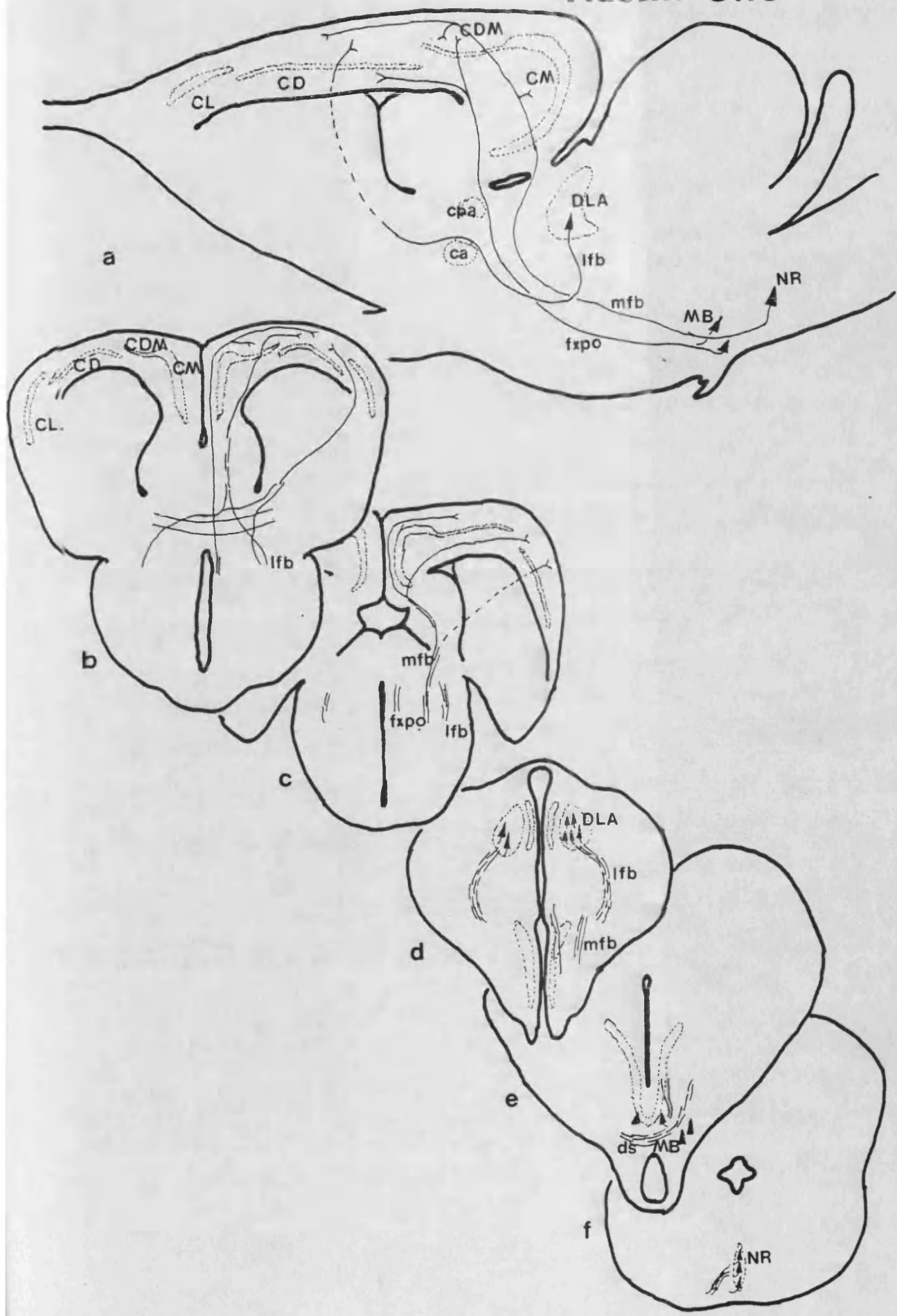


Fig. 3.16.- Microfotografías que muestran el marcaje retrógrado en las dos subregiones del núcleo dorsolateral anterior del tálamo: pars magnocellularis (pm) y pars parvicellularis (pp)

a) inyección en el cortex dorsomedial con bastante difusión al cortex medial y subregión medial del cortex dorsal observese que las neuronas marcadas retrógradamente se localizan en la pars parvicellularis. En los casos de inyección restringida al cortex dorsomedial el marcaje retrógrado es mucho menos prominente. Ejemplar 2132 Podarcis hispanica. Barra de referencia 200 um

b) inyección en la porción latero-rostral del cortex dorsal de Podarcis hispanica (Ejemplar 959). Observese que el marcaje en la pars magnocellularis es complementario del observado en a. Barra de referencia 200 um

c) neuronas globulares grandes de la pars magnocellularis en la que se pueden observar también neuronas de pequeño tamaño como la que aparece recuadrada que ha sido ampliada en b. Barra de referencia 50 um

d) neurona triangular pequeña de la pars magnocellularis, este tipo neuronal también esta presente en la pars parvicellularis. Barra de referencia 20 um

FIGURA 3.16

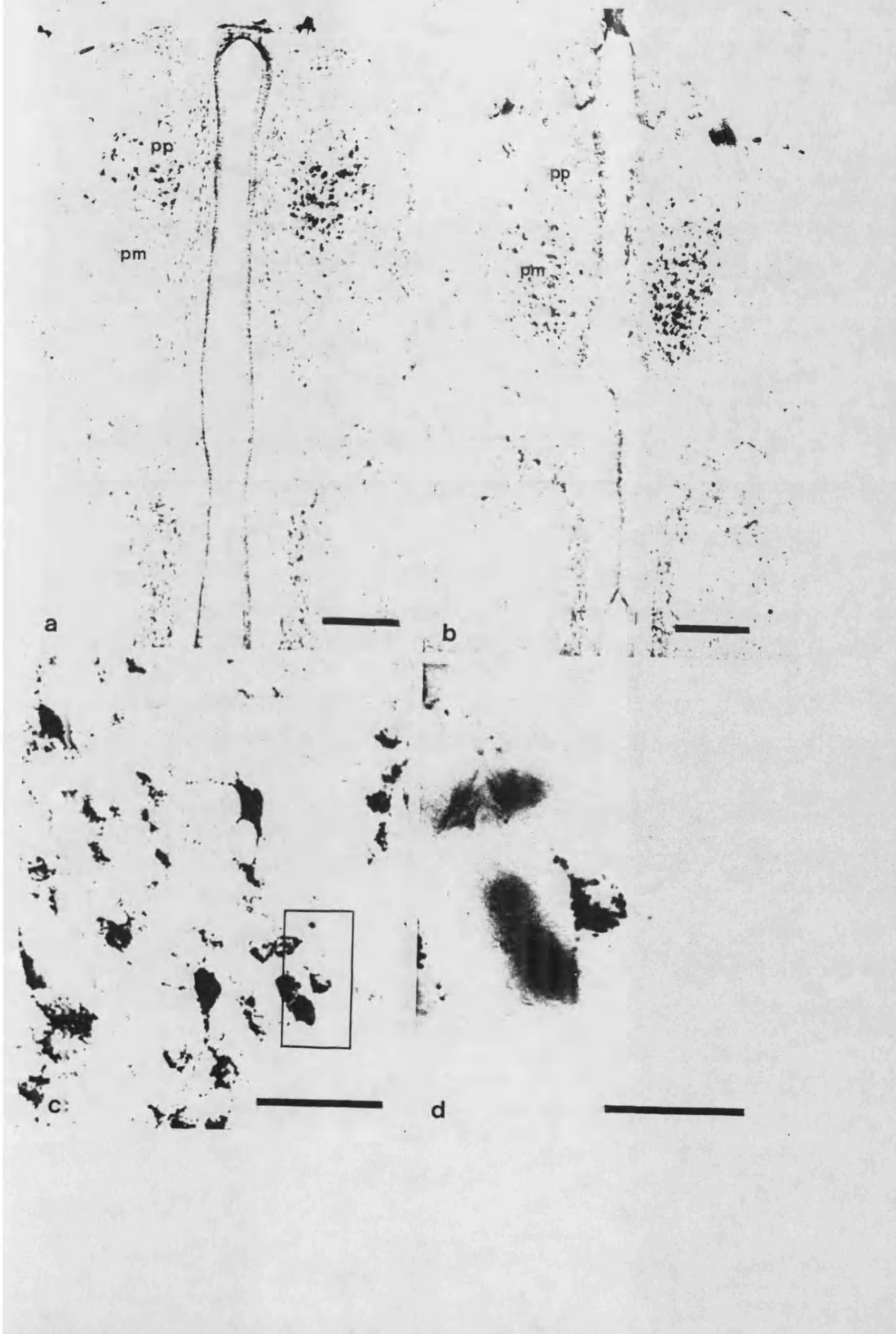


Fig. 3.17.- Dibujos realizados con cámara clara en los que se representa la ruta seguida por los axones procedentes del núcleo dorsolateral anterior. Dichos axones alcanzan la corteza cerebral por dos vías (lateral (l) y medial(m)).
Ejemplar 847 Gallotia stehlinii

FIGURA 3.17

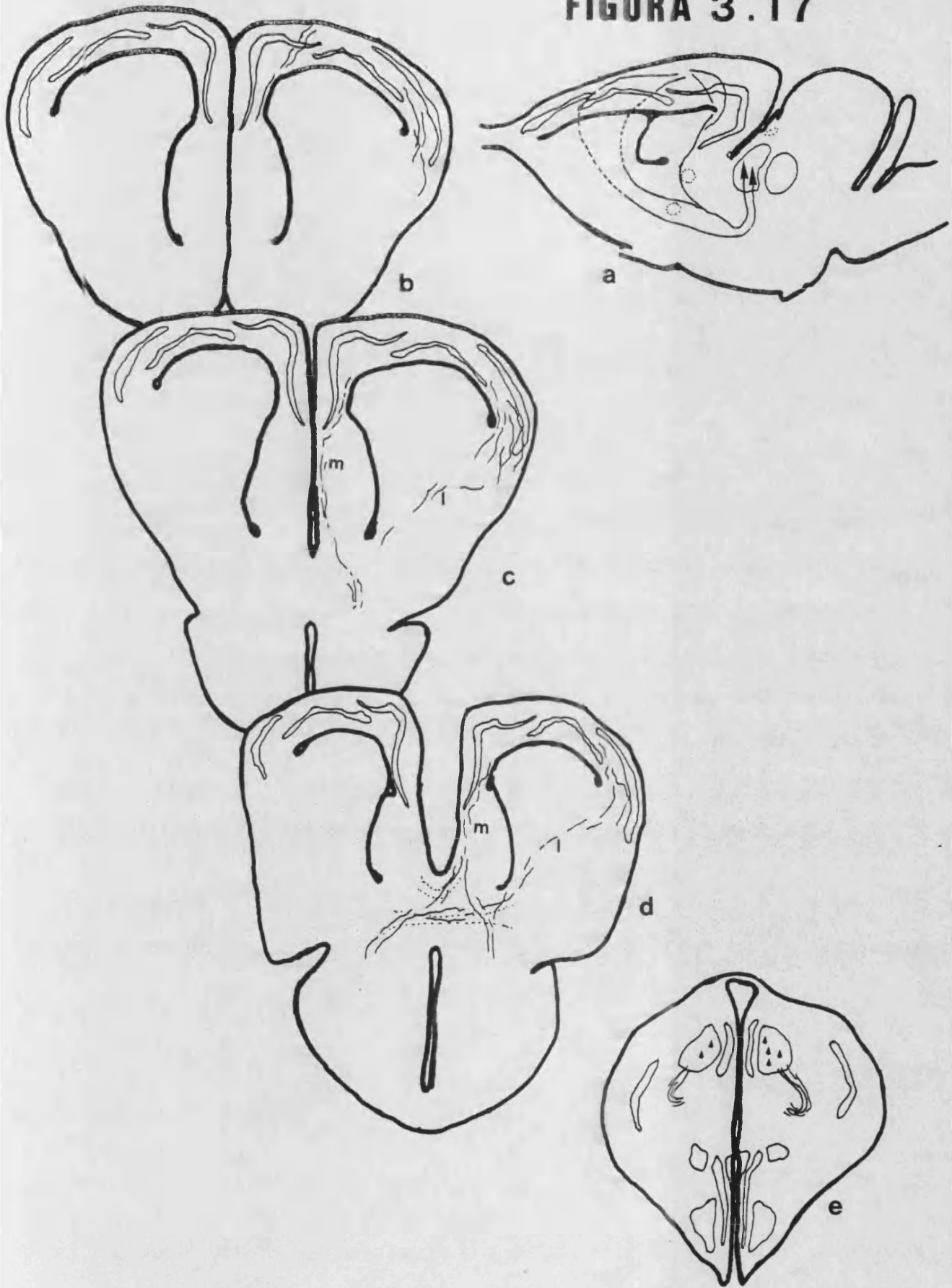


Fig. 3.18.- Marcaje retrógrado en los cuerpos mamilares hipotalámicos. Dicho marcaje se localiza tanto en el núcleo mamilar lateral (ML) ipsilateralmente, como en el núcleo supramamilar (SM) bilateralmente. Este último núcleo se sitúa por encima de la decusación supramamilar (dsm) en la que se observan axones marcados procedentes del núcleo del rafe superior.

- a) Podarcis hispanica . Barra de referencia 100 um
- b) Gallotia stehlinii . Barra de referencia 200 um

FIGURA 3.18

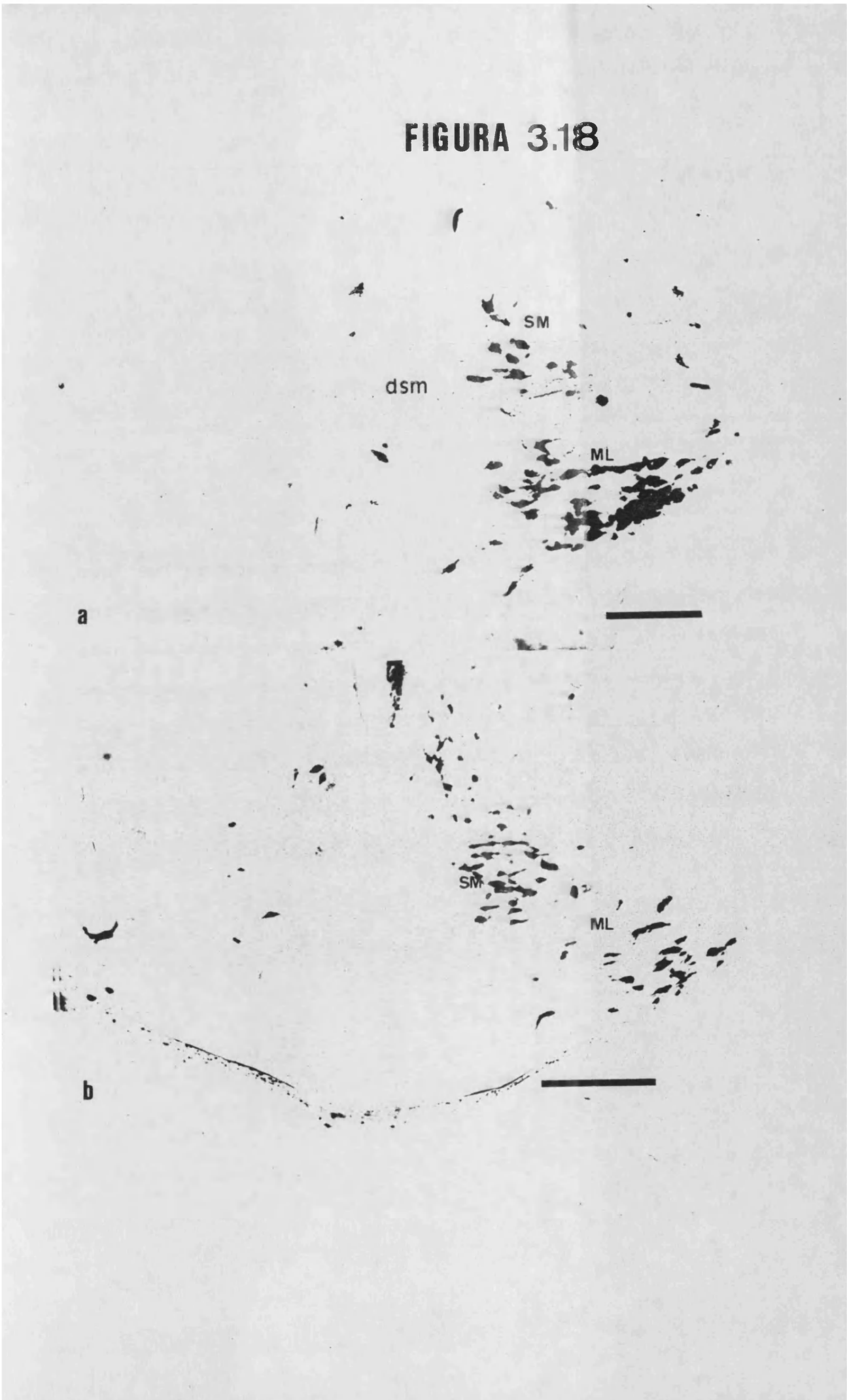


Fig. 3.19.- Dibujos realizados con cámara clara en los que se representa la ruta seguida por un axón que acaba en los cuerpos mamilares (MB) y que ha sido seguido hasta la capa plexiforme externa del cortex medial (CM) en el ejemplar 849 de Gallotia stehlinii. Observese que este axón (flechas) utiliza el fornix postcomisural (fxpo) como vía de acceso a la corteza cerebral.

FIGURA 3.19

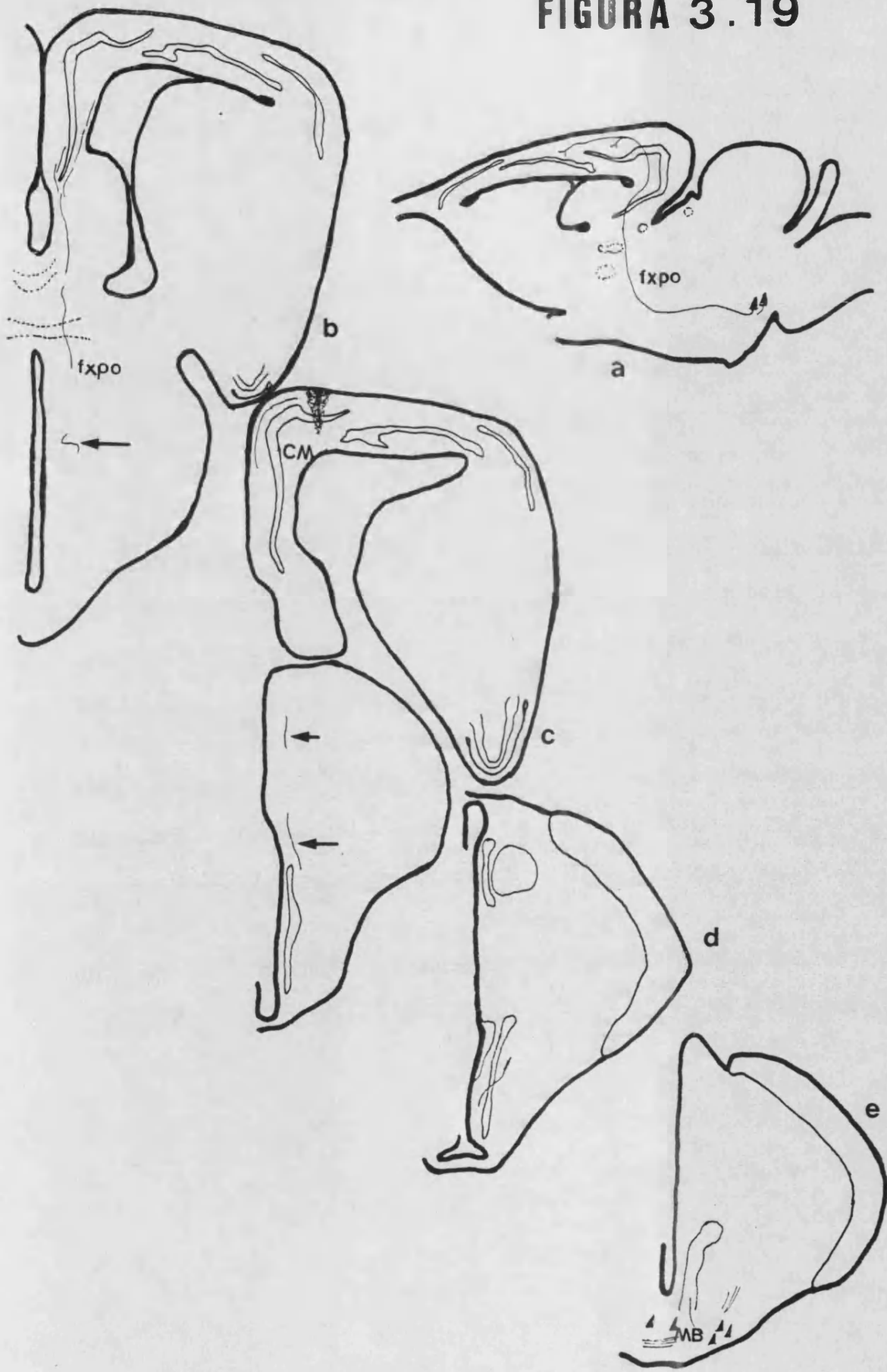


Fig. 3.20.- Microfotografías que muestran el marcaje retrógrado en el núcleo del rafe superior tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial y el cortex dorsal.

a) inyección en el cortex dorsomedial de Gallotia stehlinii (ejemplar 847) en la que se muestra la lateralidad del núcleo del rafe, de tal modo, que las neuronas marcadas se localizan en la línea contralateral a la inyección (A), apareciendo la ipsilateral (↑) con escaso marcaje. Barra de referencia 200 um

b) somas neuronales marcados en el núcleo del rafe tras inyección en el cortex dorsal de Podarcis hispanica (ejemplar 928). Barra de referencia 100 um.

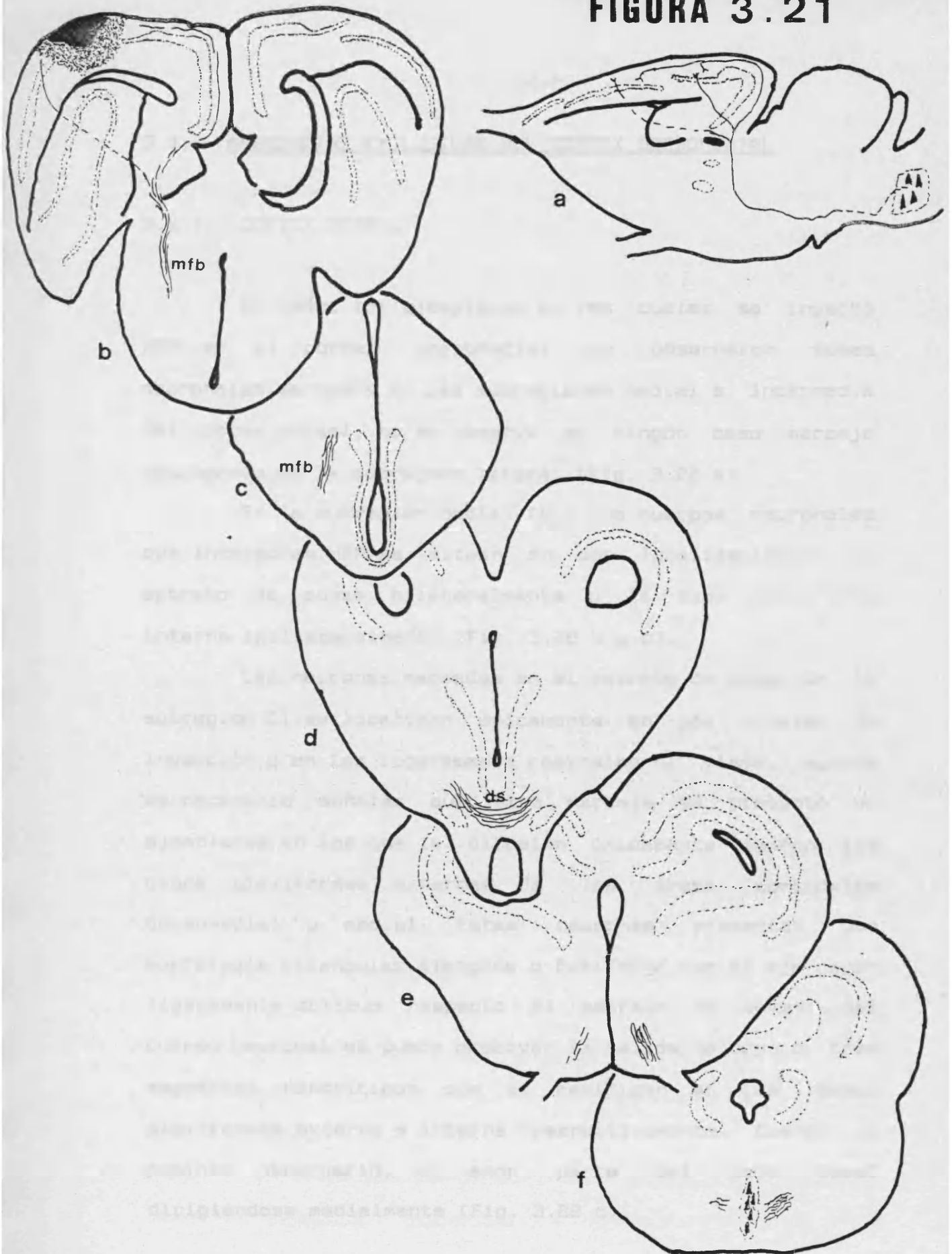
c) axones marcados procedentes del núcleo del rafe que atraviesan la decusación supramamilar (ds). Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.20



Fig. 3.21.- Dibujos realizados con cámara clara en los que se representa la trayectoria de los axones marcados desde el núcleo del rafe superior. Observese que la mayor parte de los axones discurren por el tronco cerebral por el lado contralateral, pasando al diencéfalo ipsilateral a través de la decimación supramamilar (ds) integrándose finalmente en el fascículo prosencefálico medial (mfb)

FIGURA 3.21



3.4.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS DEL CORTEX DORSOMEDIAL

3.4.1.- CORTEX DORSAL

En todos los ejemplares en los cuales se inyectó HRP en el cortex dorsomedial se observaron somas neuronales marcados en las subregiones medial e intermedia del cortex dorsal, no se observó en ningún caso marcaje retrógrado en la subregión lateral (Fig. 3.22 a).

En la subregión medial (D1) los cuerpos neuronales que incorporan HRP se sitúan en dos localizaciones: el estrato de somas bilateralmente y la capa plexiforme interna ipsilateralmente (Fig. 3.22 b y c).

Las neuronas marcadas en el estrato de somas de la subregión D1 se localizan únicamente en los niveles de inyección y en los ligeramente rostrales al mismo, aunque es necesario señalar que este marcaje se presentó en ejemplares en los que la difusión únicamente abarcó las capas plexiformes externas de las áreas corticales dorsomedial y medial. Estas neuronas presentan una morfología triangular alargada o fusiforme con el eje mayor ligeramente oblicuo respecto al estrato de somas; del cuerpo neuronal se puede observar la salida de dos o tres segmentos dendríticos que se ramifican en las capas plexiformes externa e interna respectivamente. Cuando es posible observarlo, el axón parte del polo basal dirigiéndose medialmente (Fig. 3.22 c).

Además de las neuronas del estrato de somas también se ha observado marcaje retrógrado en las que conforman el denominado "cell plate" localizado en la capa plexiforme interna del cortex dorsal, el cual a niveles caudales se situa por debajo de la subregión D1. Las neuronas marcadas en esta localización presentan un cuerpo neuronal globular o fusiforme del cual parten radialmente hasta 4 prolongaciones dendríticas que corren a paralelas a la membrana endimaria. Adicionalmente en algún caso se ha observado una prolongación que presenta un curso ascendente que parece terminar en la capa plexiforme interna del cortex dorsomedial (Fig. 3.22 c).

El marcaje retrógrado más prominente del cortex dorsal se presenta en la subregión intermedia (D2). Las neuronas marcadas de esta localización se sitúan exclusivamente en la porción lateral de la subregión en su límite con la subregión lateral (Fig. 3.22 a).

Las neuronas marcadas en esta localización presentan un cuerpo neuronal de morfología triangular del cual parten 3 ramificaciones dendríticas dos del polo apical y una del polo basal o a la inversa (una del polo apical y dos del polo basal). El axón parte del polo basal dirigiéndose medialmente a través del alveus y emitiendo colaterales axónicas a nivel del cortex dorsomedial y del cortex medial.

En todos los casos tanto en Gallotia stehlinii como en Podarcis hispanica el marcaje retrógrado en la

subregión D2 se localizó en niveles rostrales respecto al punto de inyección (Fig. 3.23).

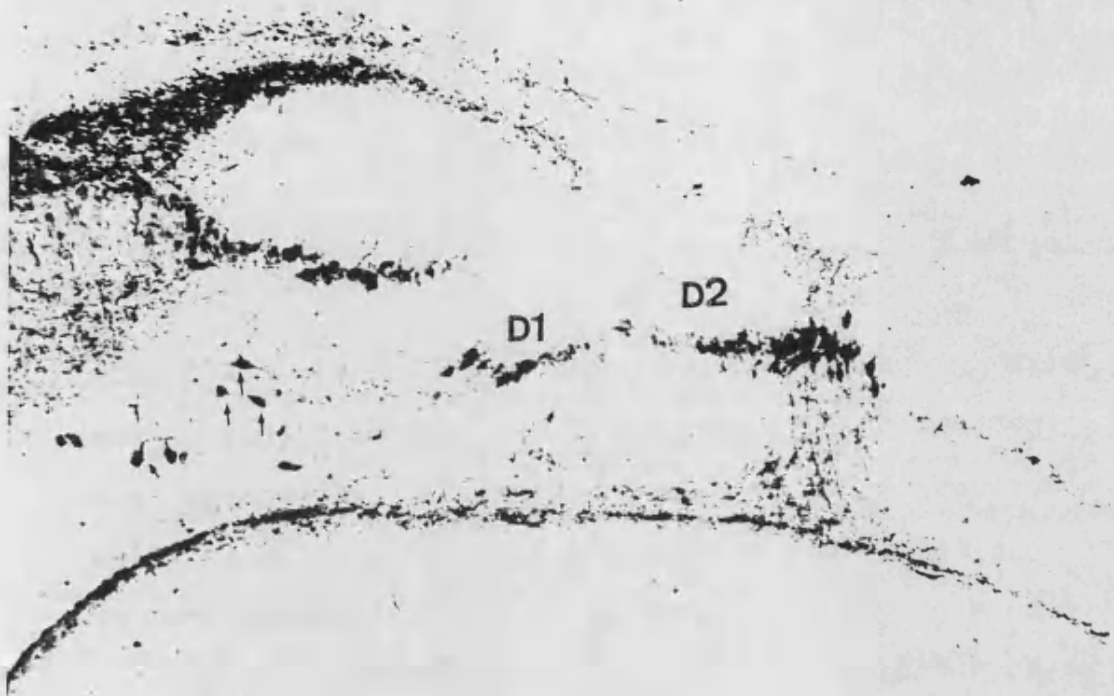
Fig. 3.22.- Marcaje retrógrado en el cortex dorsal tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial.

a) cortex dorsal ipsilateral; observese que los cuerpos neuronales marcados se localizan en las subregiones D1 y D2, también se observa marcaje retrógrado en los somas neuronales de las capas plexiforme interna del cortex dorsomedial (↑). Barra de referencia 300 um

b) subregión D1 ipsilateral; observese que algunos de los somas neuronales (▲) marcados se localizan en la capa plexiforme interna y presentan un axón ascendente (↑). Barra de referencia 20 um

c) cortex dorsal contralateral; los somas neuronales marcados (↑) se localizan en la subregión D1 y presentan una morfología fusiforme. Barra de referencia 100 um

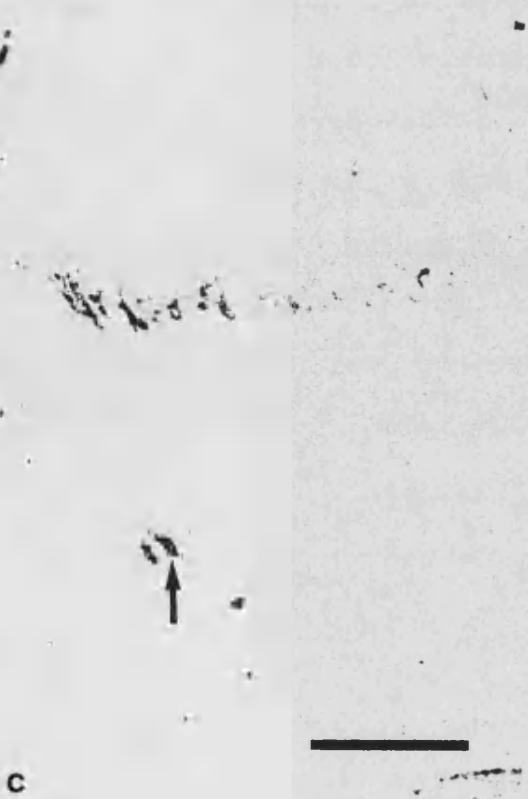
FIGURA 3.22



a



b



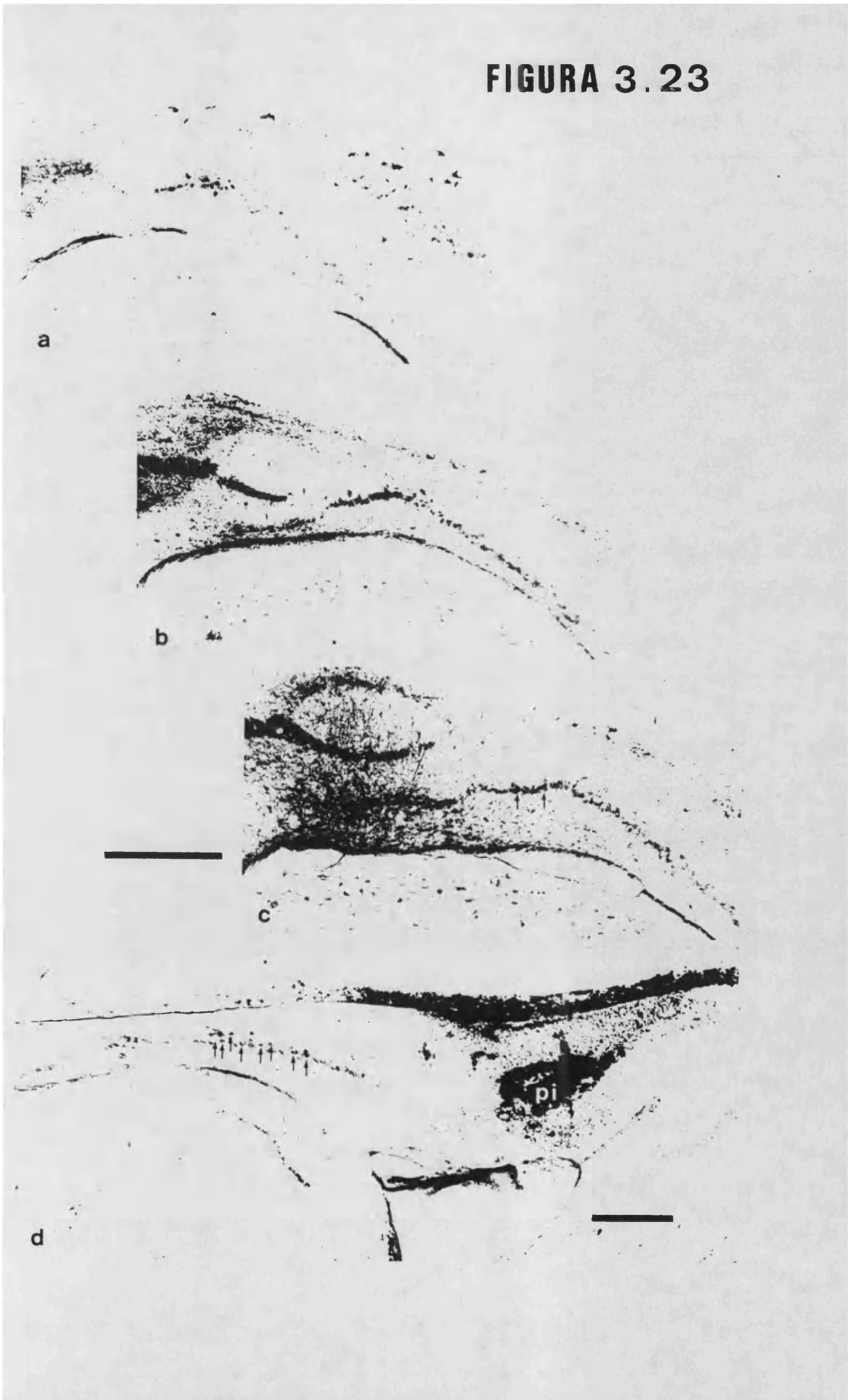
c

Fig. 3.23.- Localización topográfica del marcaje retrógrado en la subregión D2 del cortex dorsal en cortes transversales (a, b, c) y longitudinal (d). Observese que el marcaje retrógrado se localiza siempre en los niveles rostrales al punto de inyección que se localiza en el cortex dorsomedial (p.i.)

a, b, c) Gallotia stehlinii (ejemplar 846), niveles muy rostral (a), rostral (b) y ligeramente caudal al punto de inyección (c); observese que en este último nivel el marcaje retrógrado es muy escaso. Barra de referencia 200 um

d) Podarcis hispanica (ejemplar 971) en corte longitudinal. Observese la localización del punto de inyección y el marcaje retrógrado. Barra de referencia 200 um

FIGURA 3.23



3.5.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS AL CORTEX DORSAL

Cuando se efectuaron inyecciones de HRP en el cortex dorsal se observó marcaje retrógrado en tres núcleos que no aparecían con somas neuronales marcados cuando las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsomedial. Dichos núcleos fueron el núcleo esférico, el área triangularis y los núcleos olfativos anteriores o formación retrobulbar (Fig. 3.24). Dicho marcaje se observó con mayor prominencia cuando las inyecciones se centraron en la subregión lateral del cortex dorsal (D3) a niveles rostrales.

3.5.1.- NUCLEO ESFERICO

El marcaje retrógrado del núcleo esférico se presenta fundamentalmente en somas neuronales que se localizan en las porciones ventrolaterales del mismo siempre en las neuronas situadas en el estrato mural y en todos los casos observados el marcaje es bilateral (Fig. 3.25 a).

Las neuronas marcadas presentan una morfología triangular o granular generalmente con dos o tres prolongaciones dendríticas. El curso de los axones marcados es impreciso, no obstante se pueden observar trayectos cortos de estos en las proximidades de las neuronas marcadas que se dirigen latero-rostralmente hasta alcanzar el borde lateral del hemisferio. Las neuronas marcadas en

el hemisferio contralateral, en cambio, dirigen sus axones al hemisferio ipsilateral a través de la comisura anterior.

3.5.2.- AREA TRIANGULARIS

Esta región se localiza en el extremo rostral del tálamo en posición medial respecto a la stria terminalis y lateral respecto al fascículo prosencefálico medial (MFB). Los somas neuronales marcados se localizan siempre en el lado ipsilateral a la inyección.

En algún caso el marcaje de estas neuronas fué muy prominente observandose en estos casos imagenes de tipo golgi de las neuronas marcadas. Dichas neuronas presentan un aspecto fusiforme o triangular con dos o tres prolongaciones dendriticas respectivamente. El axón parte lateralmente uniendose con las fibras del fascículo prosencefálico medial procedentes del núcleo del rafe (Fig. 3.25 b)

3.5.3.- NUCLEOS OLFATIVOS ANTERIORES

Los nucleos olfativos anteriores se localizan en las porciones anteriores del telencéfalo dorsal antes de la aparición de las áreas corticales dorsal y medial justo por delante de la porción anterior de la cresta ventricular dorsal (ADUR). Tras inyecciones en D3 se observaron somas neuronales marcados en la porción ventral de este núcleo,

dicho marcaje se presentó en todos los casos enmascarado por un marcaje de referencias (Fig. 3.25 c).

Las neuronas marcadas en la porción ventral se sitúan rostralmente respecto al ADVR limitando medialmente con el ventrículo lateral. Las neuronas que presentan marcaje en esta localización son de aspecto poligonal a granular con tres o cuatro ramas dendríticas que parten radialmente del soma. Los axones de estas neuronas parten en dirección ventro-caudal hasta llegar al borde lateral del telencéfalo donde se une con las fibras del tracto olfativo lateral llegando a la subregión D3 del cortex dorsal de un modo lateral.

Fig. 3.24.- Esquema en el que se representan las aferencias exclusivas del cortex dorsal en corte longitudinal (a) y transversales (b, c, d).

Abreviaturas: AI, área triangularis; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; NE, núcleo esférico; NOA, núcleos olfativos anteriores.

FIGURA 3.24

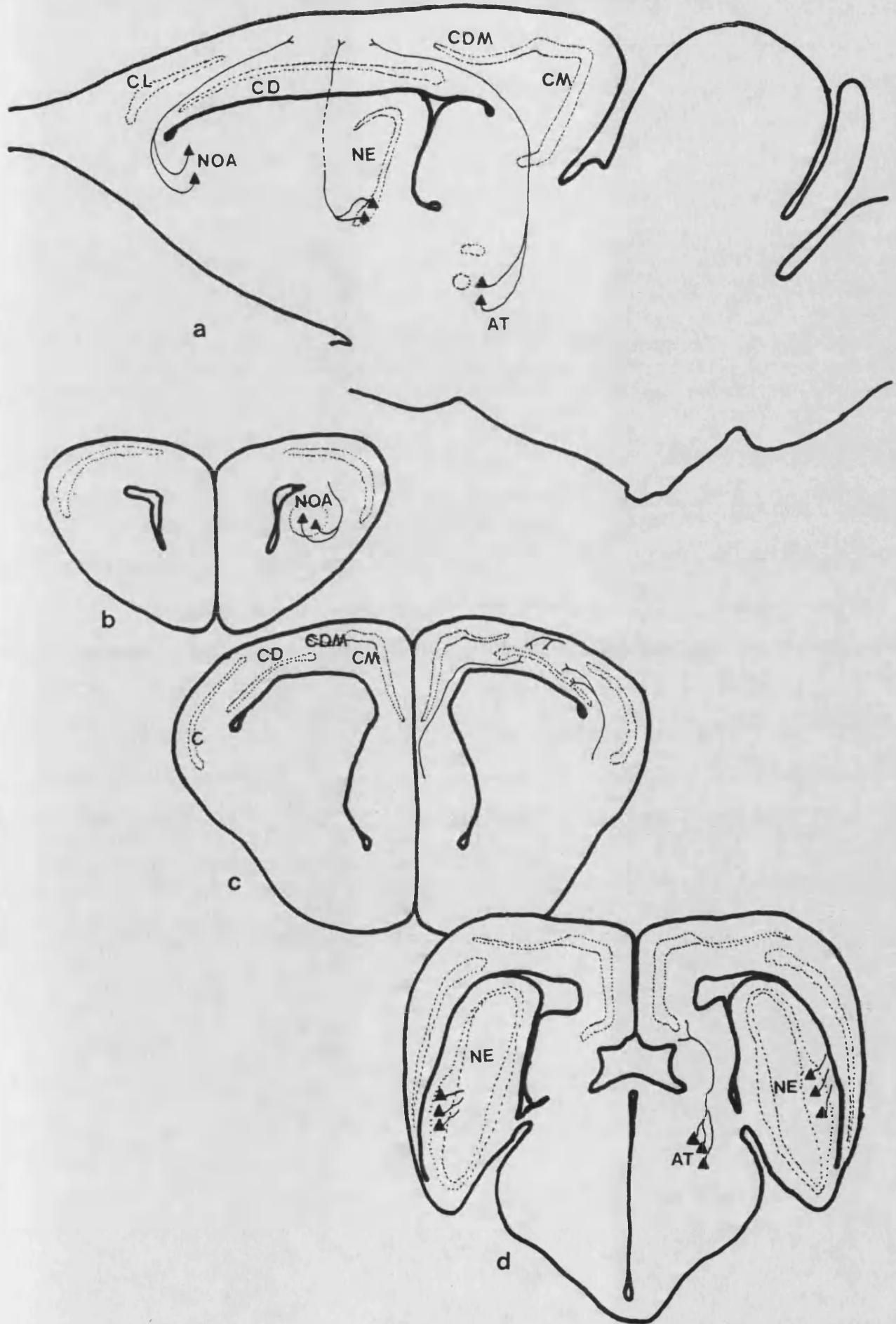


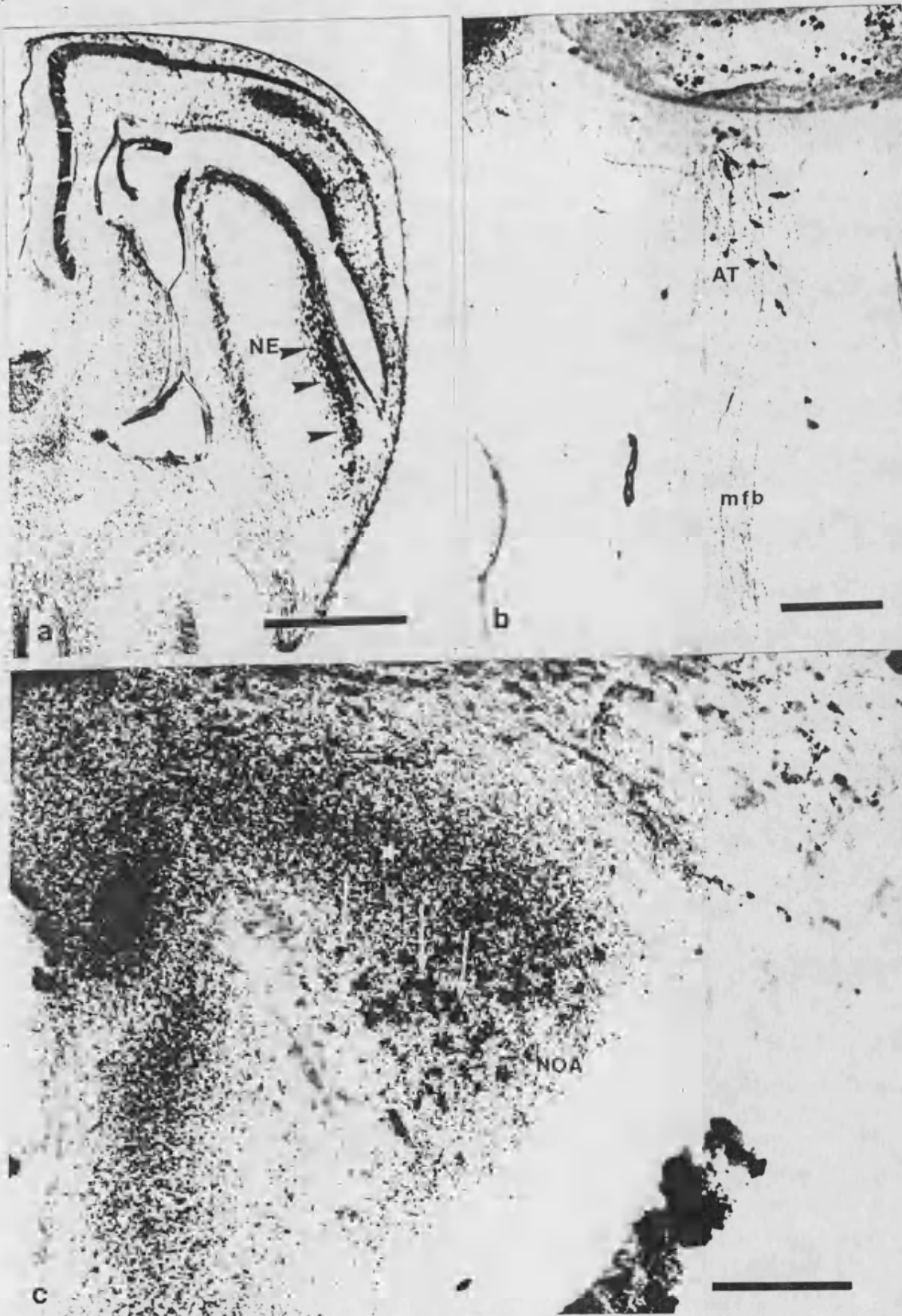
Fig. 3. 25.- Marcaje retrógrado exclusivo del cortex dorsal.

a) núcleo esférico ipsilateral (NE). Observese que el marcaje retrógrado (▲) se localiza en la porción lateral del núcleo. Barra de referencia 400 um

b) área triangularis (AT). Observese que los somas neuronales marcados se localizan entre las fibras del fascículo prosencefálico medial (mfb). Barra de referencia 100 um

c) núcleos olfativos anteriores (NOA). El marcaje retrógrado (↑) se localiza entre el marcaje anterógrado (★) muy prominente. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.25



3.6.- EFERENCIAS DEL CORTEX DORSOMEDIAL

Las distintas inyecciones de HRP trajeron consigo, además del marcaje de somas neuronales cuyos axones proyectan o pasan a través del área inyectada, un denso punteado de granulos de producto de reacción no ligado a somas neuronales y que delimitan perfectamente zonas de proyección dicho marcaje de eferencias se presentó a tiempos de supervivencia inferiores al marcaje retrógrado.

En el caso del cortex dorsomedial, el marcaje anterógrado se localizó exclusivamente en estructuras telencefálicas (Fig. 3.26), exactamente en las mismas regiones de ambos hemisferios aunque la densidad del marcaje anterógrado fué siempre mayor en el hemisferio ipsilateral que en el contralateral.

3.6.1.- SALIDA DE AXONES EFERENTES

Del punto de inyección en el cortex dorsomedial se pudo seguir la salida de tres grupos de axones eferentes, todos ellos con una trayectoria inicial descendente.

El primer grupo se dirige directamente hacia la capa plexiforme interna del cortex medial donde forma una banda de eferencia en la porción yuxtgranular de la mencionada capa.

El segundo grupo de axones parte de la capa plexiforme interna del cortex dorsomedial y se incurvan

lateralmente tomando una trayectoria ascendente a través de la superposición medial. Cuando alcanzan las capas plexiformes externas el haz de fibras se divide en dos grupos que se dirigen medial y lateralmente situándose sobre el cortex dorsomedial y dorsal respectivamente.

Por último, el tercer grupo de fibras entran en el alveus cortical y se dirigen hacia la comisura paleal anterior. Durante esta corta trayectoria los axones emiten colaterales que se dirigen hacia el septum ipsilateral. Las fibras que pasan al hemisferio contralateral ingresan en la fimbria emitiendo colaterales que se dirigen al septum contralateral alcanzando el alveus contralateral desde donde se observa de nuevo la salida de colaterales axónicas hacia las áreas paleales medial y dorsomedial. Finalmente estas fibras ascienden entre los somas de la subregión medial del cortex dorsal acabando en la capa plexiforme externa de esta misma región cortical.

3.6.2.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX MEDIAL

En el cortex medial se pueden observar tres bandas de eferencias tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial. Tanto en el hemisferio de inyección como en el contralateral, siendo en este último el marcaje mucho menos prominente. En la capa plexiforme externa se observan dos bandas de eferencias una ocupa el 1/3 yuxtgranular y la segunda es una delgada banda que se situa entre el 1/3

yuxtgranular y el 1/3 intermedio. En la capa plexiforme interna la banda de eferencia ocupa la zona yuxtgranular Timm negativa (Fig. 3.27).

La banda situada en el 1/3 yuxtgranular de la capa plexiforme externa se localiza fundamentalmente en los niveles de inyección y en los rostrales al mismo y se continua con una banda sobre la zona Timm negativa del cortex dorsomedial. Dicha banda fué particularmente prominente cuando las inyecciones se efectuaron en los niveles caudales del cortex dorsomedial (Fig. 3.27 a-c). En los ejemplares en los cuales la inyección de HRP se centró en los niveles rostrales, esta banda de eferencia presentó un marcaje anterógrado notablemente inferior al observado en la capa plexiforme interna (Fig. 3. 27 d-f).

La delgada banda de eferencia entre el 1/3 medio y el 1/3 yuxtgranular en la capa plexiforme externa siempre se presenta a niveles caudales al punto de inyección siendo esta banda continua con la yuxtgranular. Entre el denso marcaje similar a terminales axónicos se pueden observar en esta banda trayectos axónicos largos orientados paralelamente al estrato de somas (Fig. 3.27 c).

La banda de eferencia en la capa plexiforme interna presenta un mayor espesor en las porciones dorsales (subregión M1-3) y se estrecha progresivamente hacia las porciones ventrales (M1-1) y es complementaria de la banda Timm positiva en esta capa plexiforme del cortex medial. Es en todos los casos mas prominente en los niveles rostrales

a la inyección que en los caudales al mismo, aunque también en estos últimos es perfectamente observable (Fig. 3.27 d-f). Por último la intensidad del marcaje de esta banda es independiente de la localización del punto de inyección a lo largo del eje rostro-caudal.

En los tres casos, las fibras marcadas en las áreas de proyección del cortex dorsomedial sobre el cortex medial presentan una trayectoria tortuosa con engrosamientos periódicos y varicosidades que hacen suponer la existencia de contactos sinápticos con botones de paso.

En las mismas zonas del cortex medial contralateral se observa un marcaje anterógrado similar que ocupa las mismas bandas que las descritas en el hemisferio ipsilateral. Sin embargo, hay que señalar que el marcaje de eferencia que se presenta en la capa plexiforme interna es en todos los casos mucho más conspicuo que el de las bandas de la capa plexiforme externa.

Los axones procedentes del cortex dorsomedial que originan la proyección contralateral sobre el cortex medial ingresan en la corteza cerebral a través del alveus donde pueden observarse fibras que originan colaterales ascendentes que se dirigen a la capa plexiforme interna del cortex medial. Asimismo, se han observado con cierta frecuencia la presencia de axones en la capa plexiforme interna que atraviesan el estrato de somas para llegar a la capa plexiforme externa donde toman una trayectoria paralela al mencionado estrato.

3.6.3.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX DORSAL

Desde la capa plexiforme interna del cortex dorsomedial parte un grupo de fibras ascendentes que se localizan en su tramo inicial en la superposición medial entre las áreas corticales dorsomedial y dorsal estas fibras una vez alcanzan las zonas Timm negativas de las capas plexiformes externas se incurvan lateralmente presentando una trayectoria paralela a la membrana glial y formando una delgada banda de eferencia en la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa del cortex dorsal (Fig. 3.28 a).

A lo largo de esta banda de eferencia los axones presentan varicosidades y engrosamientos periódicos y se encuentran estrechamente agrupados sobre las subregiones D1 y D2 donde subyacen somas neuronales que incorporan retrógradamente el enzima. En la subregión D3 el marcaje anterógrado si esta presente se confunde con los axones procedentes del núcleo dorsolateral anterior que llegan al cortex dorsomedial por via lateral.

Respecto a la topografía de esta proyección practicamente coincide con el marcaje retrógrado observado en la subregión D2, por lo tanto, el marcaje anterógrado se localiza fundamentalmente a niveles rostrales del cortex dorsal, sin embargo, este marcaje no es tan prominente a niveles muy rostrales.

En el cortex dorsal contralateral se puede observar también la presencia de axones eferentes en la misma localización topográfica que en el cortex dorsal ipsilateral, no obstante, el marcaje en este caso no es tan conspicuo como en el hemisferio ipsilateral. Los axones que forman la proyección contralateral proceden del alveus y llegan hasta la zona de proyección a través de la superposición medial.

En ocasiones fué posible observar algunos axones en el hemisferio contralateral que parecen envolver los cuerpos neuronales de la subregión medial del cortex dorsal. Este hecho es también observable en hemisferio ipsilateral, sin embargo, en el contralateral se puede observar además que el axón que recorre un corto trayecto entre los somas de D1 vuelve a ascender hacia la capa plexiforme externa localizandose posteriormente en la zona Timm negativa. En ningún caso se observaron axones marcados sobre la subregión D3.

3.6.4.- EFERENCIAS SOBRE SEPTUM

De las fibras que descienden a través del alveus al llegar al nivel del septum dorsal se observa la salida de colaterales axónicos que se dirigen lateralmente a la mencionada región septal. Estas fibras se incurvan al llegar a la proximidad del ventriculo lateral tomando una trayectoria ascendente paralela a la pared ependimaria

dirigiéndose hacia niveles más caudales y dorsales donde forman una banda de eferencia muy delgada en el límite más dorsal del septum (Fig. 3.28 b).

En el hemisferio contralateral, del haz de fibras que ascienden a través de la comisura paleal anterior hasta la fimbria cortical se observa la salida de colaterales que se dirigen lateralmente hacia la porción más dorsal del septum postcomisural donde puede observarse marcaje anterógrado disperso en la misma localización que el descrito en el septum ipsilateral.

3.6.5.- REFERENCIAS SOBRE EL PROPIO CORTEX DORSOMEDIAL.

Algunos de los axones marcados que ascienden por la superposición medial al llegar a la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa se incurvan medialmente presentando una trayectoria paralela a la membrana glial. En esta localización los axones presentan varicosidades y engrosamientos periódicos, por lo que se pueden interpretar como una banda de eferencia, la cual se continua a niveles rostrales con la banda de eferencia del 1/3 yxtagranular de la capa plexiforme externa del cortex medial y a niveles caudales con la banda intermedia de la misma capa del cortex medial.

Esta banda se presenta en toda la extensión rostro-caudal del cortex dorsomedial. A niveles muy anteriores al punto de inyección la banda de eferencia

ocupa la mitad interna de la zona Timm negativa quedando la mitad externa libre de marcaje (Fig. 3.29 a). En este sentido, cuando acaba rostralmente el cortex dorsomedial estas fibras parecen tener una trayectoria descendente como envolviendo rostralmente la zona Timm positiva.

En los niveles próximos al punto de inyección la citada banda abarca la totalidad de la zona Timm negativa (Fig. 3.29 c). En los niveles ligeramente caudales a la inyección se observa una segregación de dos grupos de fibras, unas se continúan con la banda de eferencia del 1/3 yuxtgranular del cortex medial y otras se continúan con la banda de eferencia de los niveles caudales del cortex medial (Fig. 3.29 c).

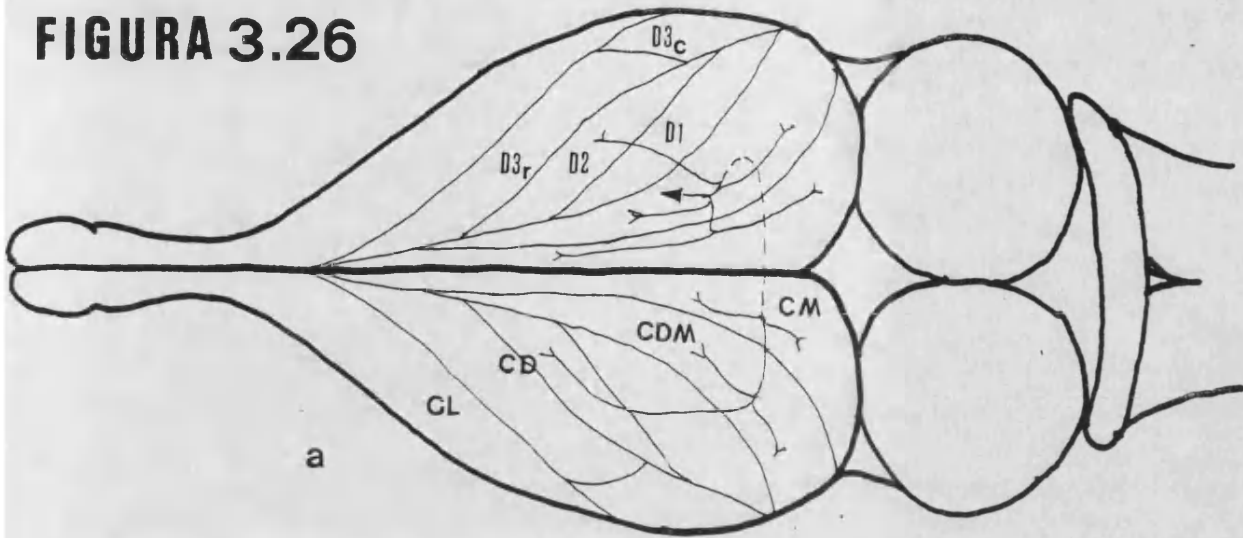
Por último, en los niveles caudales respecto al punto de inyección la banda de eferencia abarca toda la zona Timm negativa (Fig. 3.29 c).

En el hemisferio contralateral se observan dos tipos de fibras que llegan al cortex dorsomedial. Unas ascienden desde el alveus hasta alcanzar la zona Timm negativa donde toman una trayectoria paralela a la membrana glial, a lo largo de todo su recorrido los axones presentan engrosamientos periódicos similares a botones de paso. El segundo grupo de fibras proceden de la capa plexiforme externa del cortex medial y se dirigen directamente a la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial.

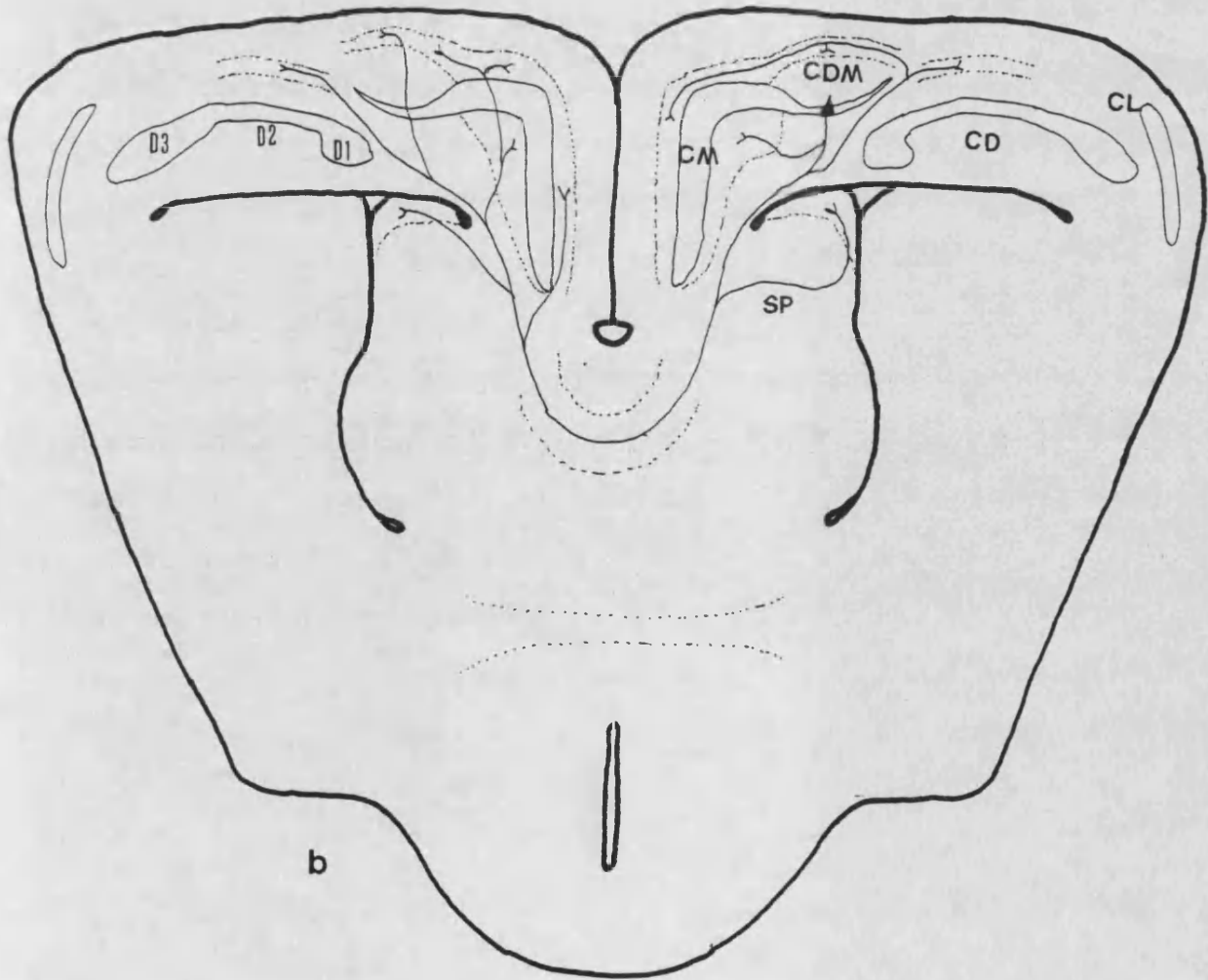
Fig. 3.26.- Esquema en el que se representan las eferencias del cortex dorsomedial en vista dorsal (a) y en corte transversal (b). Observese que las áreas de proyección son las mismas en ambos hemisferios.

Abreviaturas: CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; D1, subregión medial del cortex dorsal; D2, subregión intermedia del cortex dorsal; D3c, porción caudal de la subregión lateral del cortex dorsal; D3r, porción rostral de la subregión lateral del cortex dorsal; SP, septum.

FIGURA 3.26



a



b

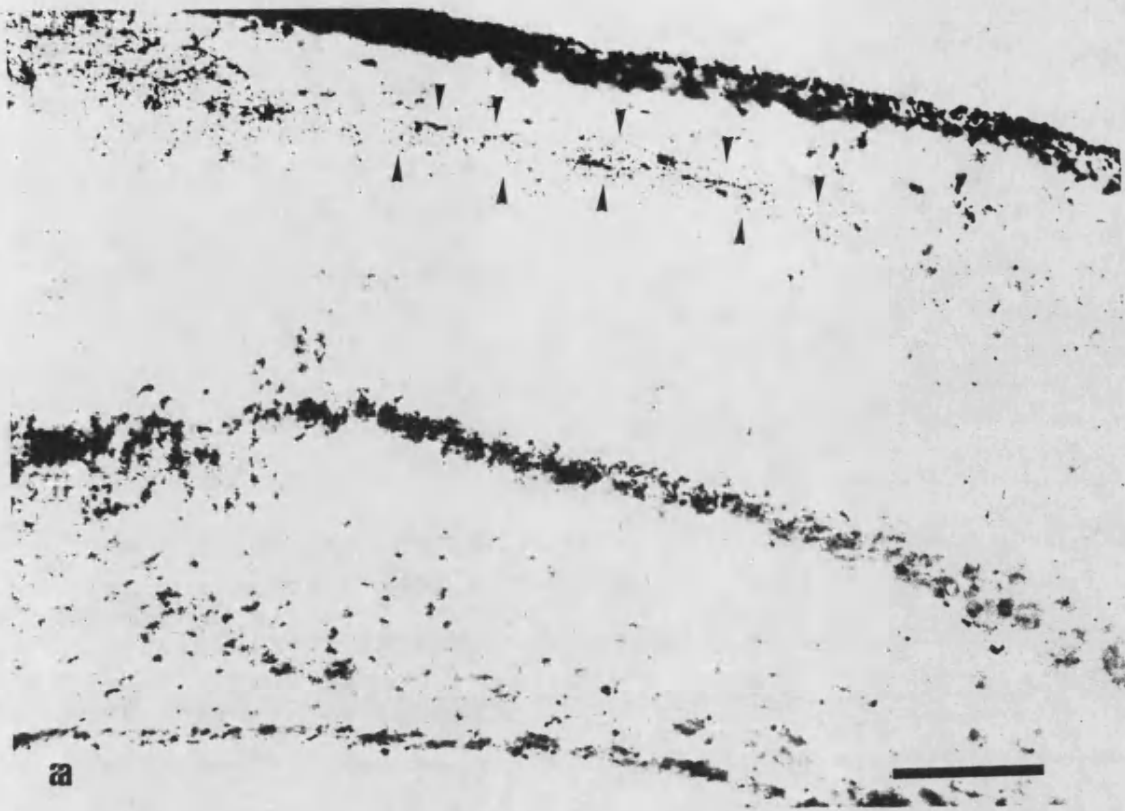
Fig. 3.27.- Marcaje anterógrado en el cortex medial tras inyección de HRP en el cortex dorsomedial cuando esta inyección se localiza a niveles caudales (a, b, c) y a niveles caudales (d, e, f). Observese que las bandas de eferencia de la capa plexiforme externa son más prominentes cuando las inyecciones se localizan a niveles caudales. La banda del 1/3 proximal al estrato de somas de la capa plexiforme externa (*) se presenta a niveles rostrales, mientras que la que forma la banda intermedia (†) se localiza a niveles caudales. Por otra parte, la banda de la capa plexiforme interna (★) se localiza fundamentalmente a niveles rostrales y se encuentra igualmente presente en ambos casos. Barras de referencia 500 um

FIGURA 3.27



Fig. 3.28.- Marcaje anterógrado en el cortex dorsal (a) y en el septum dorsal (b) tras inyección de HRP en el cortex dorsomedial. Observese que la eferencia sobre el cortex dorsal coincide con el limite lateral de la subregión D2 donde se localiza también el marcaje retrógrado. En el septum dorsal la eferencia ocupa la zona dorsal Timm negativa; las puntas de flecha señalan los limites aproximados de la proyección. Barras de referencia: en a) 100 um en b) 100 um

FIGURA 3.28



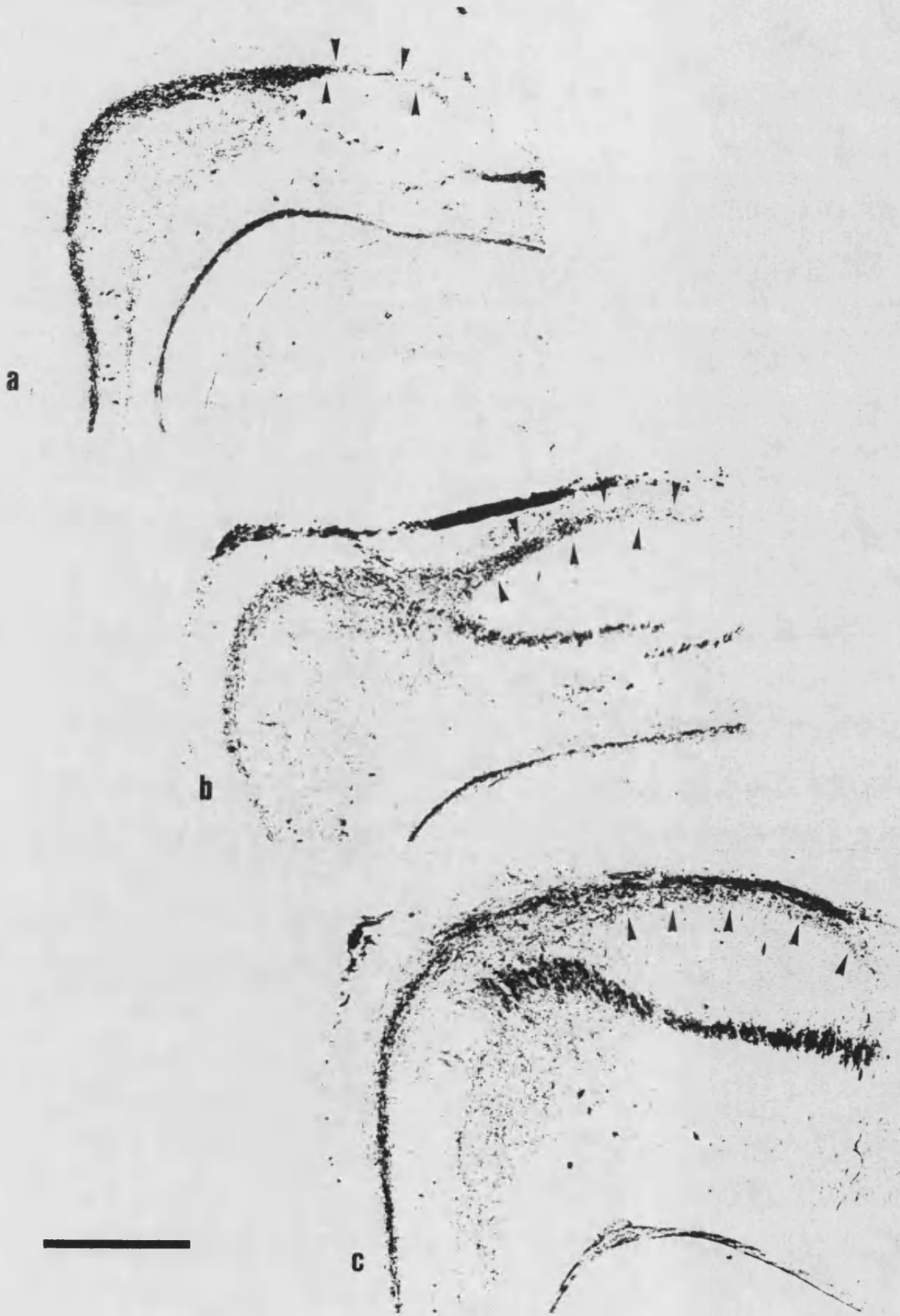
a



b

Fig. 3.29.- Evolución rostro-caudal del marcaje de referencias sobre el propio cortex dorsomedial ipsilateral (). Observese que la banda de referencia se continua sobre la capa plexiforme externa del cortex medial. A niveles rostrales la banda de referencia ocupa la mitad interna de la zona Timm negativa mientras que a niveles caudales al punto de inyección el marcaje de referencias ocupa la totalidad de esta zona Timm negativa. Barra de referencia 300 um

FIGURA 3.29



3.7.- EFERENCIAS DEL CORTEX DORSAL

Cuando las inyecciones de HRP se centraron en el cortex dorsal se obtuvieron patrones de marcaje anterógrado distintos dependiendo de la subregión del cortex dorsal afectada por la difusión del enzima. En algunos casos fué posible comprobar el origen exacto de las eferencias del cortex dorsal mediante inyecciones en las zonas de proyección.

Por otra parte, algunas de las eferencias del cortex dorsal sólo fueron observadas tras inyecciones masivas de HRP que afectaron a más de una subregión. Por ello, se trataran en principio las eferencias no especificadas y a continuación las eferencias de las tres subáreas del cortex dorsal (medial o D1, intermedia o D2 y lateral o D3) por separado.

En la figura 3.30 aparecen representadas las distintas eferencias del cortex dorsal que no pudieron ser comprobadas mediante marcaje retrógrado sino que sólomente fueron observadas mediante inyecciones masivas en el cortex dorsal. El marcaje anterógrado en estos casos se observó en el núcleo accumbens, núcleos olfativos anteriores, núcleo dorsolateral anterior del tálamo y distintos núcleos hipotalámicos. En estas regiones no fué posible inyectar HRP con objeto de comprobar dichas proyecciones mediante marcaje anterógrado, lo cual permitiría, por otra parte,

definir la o las subregiones del cortex dorsal responsables de estas eferencias.

Cuando se inyectó HRP en los niveles rostrales del cortex dorsal se observaron algunas fibras que bordean el sulcus lateralis del ventriculo lateral y se incurvan para alcanzar el DVR el cual atraviesan hasta llegar al estriado ventral desde donde se dirigen hacia niveles rostrales, localizandose finalmente en el núcleo accumbens donde se observa un debil marcaje de eferencias en el cual ocasionalmente se observan varicosidades axónicas con engrosamientos periódicos. Dicho marcaje abarca todos los niveles del núcleo accumbens (Fig. 3.31 a). Algunos de estos axones eferentes rodean el ventriculo mediálmente y dan lugar finalmente a un campo de eferencias en los núcleos anteriores del tálamo (Fig. 3.25 c).

En las dos subregiones del núcleo dorsolateral anterior del tálamo se observó un marcaje puntiforme bilateral en la mayor parte de los ejemplares inyectados en el cortex dorsal. En este núcleo talámico, el marcaje de eferencias se puede observar entre los cuerpos neuronales marcados retrógradamente y con independecia de los mismos (Fig. 3.31 b).

La ruta seguida por los axones eferentes es distinta a la que presentan los que proceden de este núcleo y proyectan sobre la corteza cerebral, de tal modo que mientras estos últimos presentan una trayectoria ventral ingresando en el pedúnculo dorsal del LFB y posteriormente

en el MFB, los primeros se dirigen dorsalmente hasta alcanzar la superficie dorsal del tálamo localizándose lateralmente respecto a la stria medullaris (Fig. 3.31 b) desde donde se dirigen hacia niveles rostrales hasta alcanzar la comisura paleal posterior la cual atraviesan hasta alcanzar la corteza cerebral.

Algunas de las fibras que parten del cortex dorsal se dirigen hacia niveles comisurales ingresando o bien en el fornix postcomisural o en el precomisural.

Los axones del fornix postcomisural entran en el diencefalo por detras de la comisura anterior dividiendose en dos ramas una de las cuales decusa hacia el hemisferio contralateral (Fig. 3.31 c) dirigiendose las dos hacia niveles ventrales y formando finalmente un área de eferencias sobre el área dorsal hipotalámica (Fig. 3.31 d) y sobre la porción interna dorsal del núcleo periventricular (Fig. 3.31 c).

3.7.1.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION MEDIAL (D1)

La subregión D1 del cortex dorsal se dispone en su mayor parte por debajo del cortex dorsomedial en la superposición medial. Este hecho, unido a las escasas dimensiones que presenta impidió obtener inyecciones restringidas en la misma. Sin embargo, en algunos ejemplares fué posible la deducción del modelo de proyecciones de D1 a través de inyecciones con escasa

difusión a las zonas adyacentes, así como por transporte retrógrado cuando el enzima se aplicó en las zonas de proyección de esta subregión. En la figura 3.32 se representan las distintas eferencias de D1.

Cuando se efectuaron inyecciones de HRP en D1 se observó un intenso marcaje puntiforme bilateral en el cortex dorsomedial y el resto de subregiones del cortex dorsal. En el cortex dorsomedial ipsilateral, a niveles caudales, el marcaje abarca la totalidad de la capa plexiforme interna y una estrecha banda en el limite de la zona Timm positiva de la capa plexiforme externa (Fig. 3.35 a). Por otra parte, en las restantes subregiones del cortex dorsal el marcaje anterógrado se localiza en la mitad yuxtgranular de la capa plexiforme externa y en la capa plexiforme interna (Fig. 3.33 a). En el hemisferio contralateral el marcaje anterógrado forma una estrecha banda superficial en las capas plexiformes externas de las áreas corticales dorsomedial y dorsal (Fig. 3.33 b).

Cuando se efectuaron inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial y en el cortex dorsal se observó un marcaje bilateral de somas neuronales en la subregión D1 contralateral (Fig. 3.22 c). En estos casos de los lugares de inyección-difusión se podía observar la salida de axones que bordean el alveus por los niveles más caudales del ventriculo lateral y se dirigen ventralmente hacia la porción caudal de la comisura paleal anterior que se observó un intenso marcaje de axones los cuales cruzan

dicha comisura e ingresan en el alveus en sus niveles más caudales dirigiéndose posteriormente hacia la subregión D1.

También se observó marcaje retrógrado en D1 cuando se efectuaron inyecciones de HRP en el bulbo olfativo accesorio, sin embargo en estos casos las neuronas marcadas se localizaron exclusivamente en el hemisferio ipsilateral (Fig. 3.40 a).

3.7.2.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION INTERMEDIA (D2)

Los somas neuronales de la subregión intermedia del cortex dorsal tan sólo aparecieron marcadas cuando las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsomedial o en el cortex medial, este marcaje se presentó exclusivamente en el hemisferio ipsilateral.

Cuando las inyecciones se efectuaron en la propia D2 se observaron una serie de regiones de marcaje anterógrado: el cortex dorsomedial, el cortex medial y el septum (Fig. 3.34).

En el cortex dorsomedial el marcaje de eferencias procedente de D2 ocupa la mitad interna de la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa la cual se localiza a niveles caudales respecto al punto de inyección, así como la totalidad de la capa plexiforme interna (Fig. 3.35 a).

En el cortex medial el marcaje anterógrado ocupa los 2/3 externos de la capa plexiforme externa a niveles

caudales al punto de inyección observándose una distinta intensidad de marcaje en el 1/3 externo y en el 1/3 medio de esta capa plexiforme (Fig. 3.35 b y c). Es necesario señalar que en algunos de estos casos la difusión abarcó también al cortex lateral, en los casos en los cuales la inyección se restringió a esta región cortical se observó una banda de eferencias que ocupaba exclusivamente el 1/3 externo de la capa plexiforme externa del cortex medial (Fig. 3.35 c), y por otra parte, los axones que forman esta banda discurren a través de la porción superficial de la capa plexiforme externa del cortex dorsal.

Los axones que dan lugar a la eferencia sobre la región septal se localizan en el alveus cortical a niveles caudales al punto de inyección desde donde entran en la región septal a niveles postcomisurales. El marcaje anterógrado en la región septal se localiza exclusivamente en el hemisferio ipsilateral formando una zona de marcaje que ocupa la porción dorsal del septum en los niveles más caudales, mientras que a niveles más rostrales se localiza en la porción central del área septal presentando una forma triangular, justo por encima del núcleo accumbens. Esta área de eferencia abarca todos los niveles septales del eje rostro-caudal (Fig. 3.36).

3.7.3.- EFERENCIAS DE LA SUBREGION LATERAL (D3)

En la subregión D3 se observó un distinto modelo de

referencias en las porciones rostrales y caudales, de tal modo que, mientras que tras inyecciones de HRP en las porciones rostrales se observó marcaje de referencias en el cortex lateral y en el núcleo esférico; cuando aquellas se centraron en las porciones caudales el marcaje de terminales se observó en la porción posterior de la cresta ventricular dorsal (PDVR), adicionalmente tras inyecciones en los bulbos olfativos se observó marcaje retrógrado en la porción caudal de D3 (Fig. 3.37).

En el cortex lateral la referencia procedente de D3 rostral ocupa una banda en la porción yuxtgranular de la capa plexiforme externa de la subregión dorsal (L1) fundamentalmente hacia niveles caudales (Fig. 3.38 b). Adicionalmente, tras inyecciones en el cortex lateral se observó marcaje retrógrado el estrato de somas de D3 rostral (Fig. 3.38 a).

Por otra parte, en inyecciones realizadas en las porciones rostrales del cortex dorsal (D3) con difusión al cortex lateral se observaron axones descendentes que se dirigen ventro-caudalmente hasta alcanzar los niveles del núcleo esférico donde se incurvan medialmente para formar un área de marcaje puntiforme entre los somas neuronales de la porción lateral de este núcleo (Fig. 3.39 a y b). Tras inyecciones masivas en la porción rostral del cortex dorsal se observó también la presencia de marcaje puntiforme entre los somas neuronales de la porción ventro-lateral del núcleo esférico contralateral, en

estos casos también se advirtió la presencia de axones marcados en la comisura anterior. Dicho marcaje no fue observado cuando las inyecciones de HRP abarcaron únicamente al cortex lateral.

Cuando se efectuaron inyecciones de HRP en las porciones caudales de D3 se observaron algunas fibras que presentaban una trayectoria lateral llegando al sulcus lateralis del ventriculo lateral e incurvandose ventralmente ingresaban en la porción caudal de la cresta ventricular dorsal (PDUR). En esta región dan lugar a un marcaje puntiforme y disperso hasta los niveles más caudales en los cuales esta región es desplazada lateralmente por el núcleo esférico (Fig. 3.39 c).

Por último, tras inyecciones de HRP en los bulbos olfativos se observaron neuronas retrógradamente marcadas en la porción caudal de D3. En inyecciones muy restringidas a la porción más rostral del bulbo olfativo principal el marcaje retrógrado en D3 fue muy escaso pero evidente, sin embargo, el marcaje más prominente se obtuvo tras inyecciones masivas en bulbo olfativo principal y accesorio (Fig. 3.40 b).

Fig. 3.30.- Esquema en el que se representan las eferencias del cortex dorsal en las que no ha sido posible determinar la o las subregiones de origen. En corte longitudinal (a) y en cortes transversales (b, c, d, e).

Abreviaturas: ACC, núcleo accumbens; ADH, área dorsal hipotalámica; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial, CL, cortex lateral; CM, cortex medial; DLA, núcleo dorsolateral anterior del tálamo; NOA, núcleos olfativos anteriores; fxps, Fornix postcomisural; PUK, núcleo periventricular del hipotálamo

FIGURA 3.30

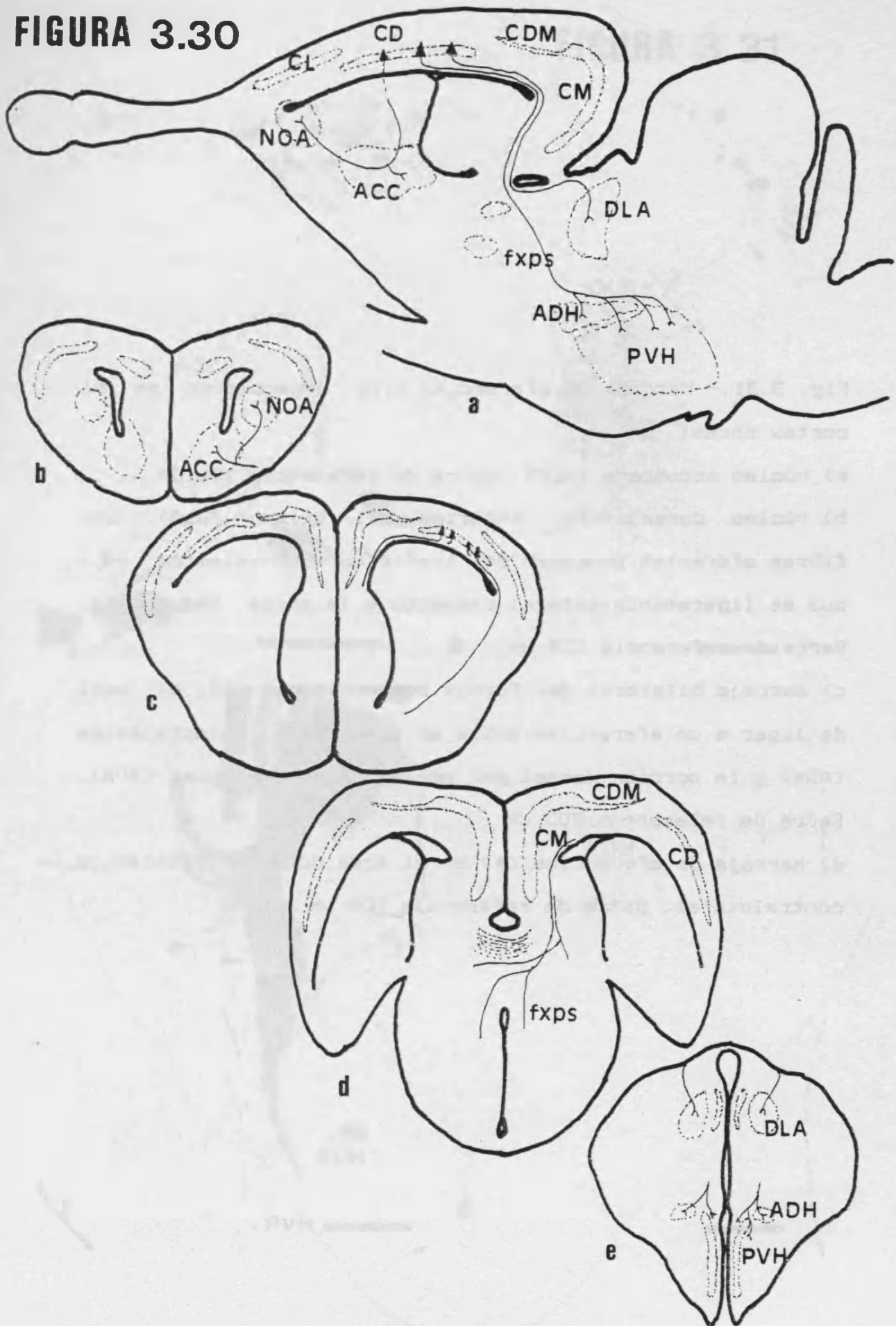


Fig. 3.31.- Marcaje de eferencias tras inyecciones en el cortex dorsal

a) núcleo accumbens (ACC). Barra de referencia 100 um

b) núcleo dorsolateral anterior del tálamo (DLA). Las fibras eferentes proceden del tracto cortico-talámico (▲) que es ligeramente lateral respecto a la stria medullaris. Barra de referencia 100 um

c) marcaje bilateral del fornix postcomisural (▲), el cual da lugar a un eferencias sobre el área dorsal hipotalámica (ADH) y la porción dorsal del núcleo periventricular (PUH). Barra de referencia 300 um

d) marcaje de eferencias (*) en el área dorsal hipotalámica contralateral. Barra de referencia 100 um

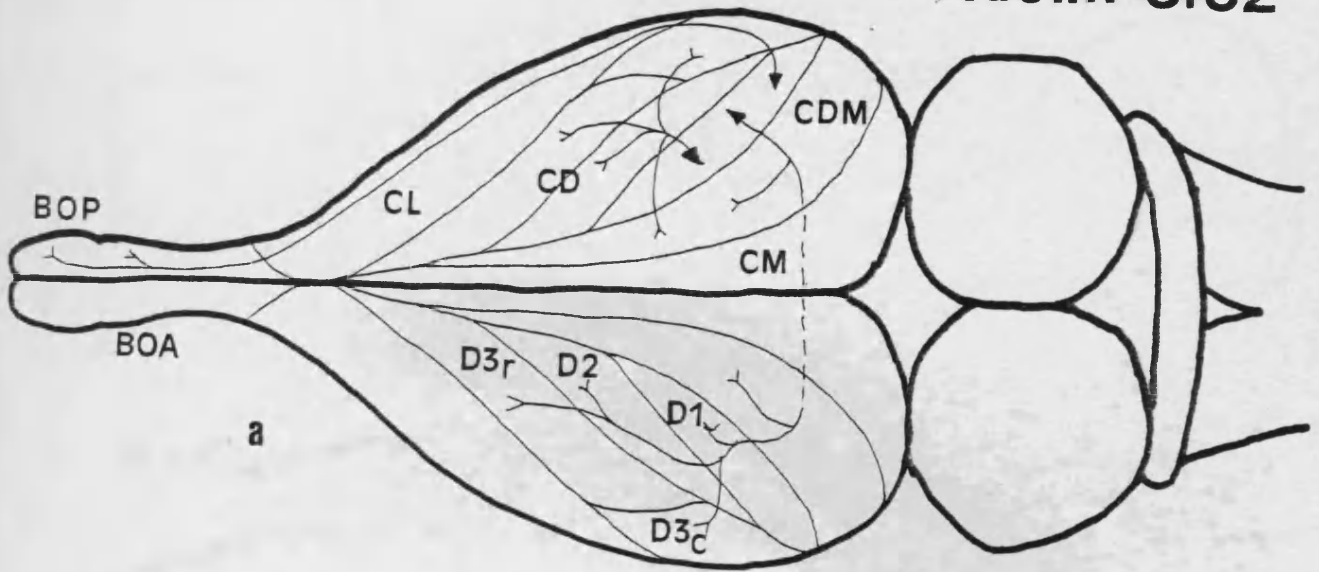
FIGURA 3.31



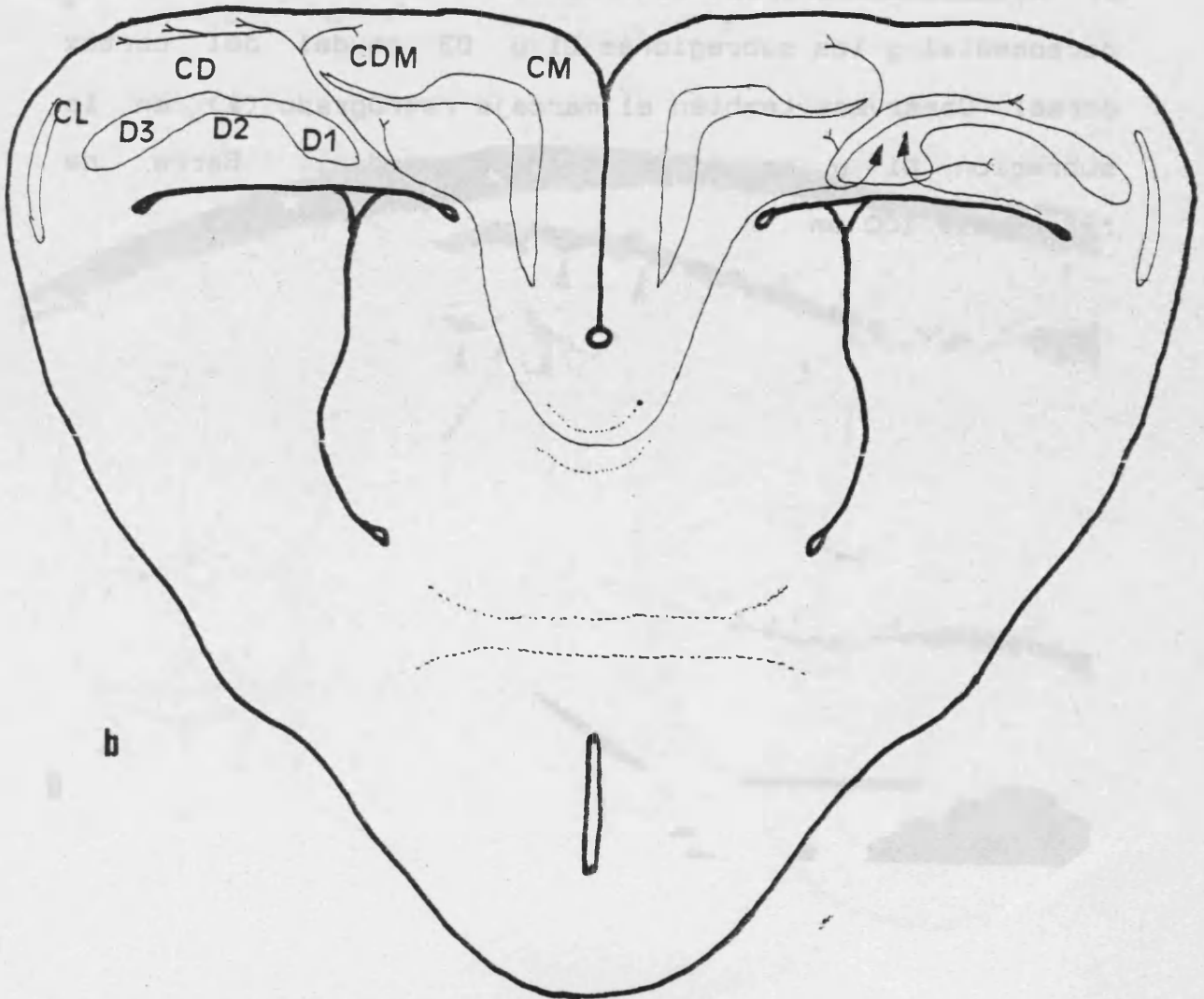
Fig. 3.32.- Esquema en el que se representan las eferencias de la subregión D1 del cortex dorsal en vista dorsal (a) y en corte transversal (b).

Abreviaturas: BOA, bulbo olfativo accesorio; BOP, bulbo olfativo principal; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; D1, subregión medial del cortex dorsal; D2, subregión intermedia del cortex dorsal; D3c, porción caudal de la subregión lateral del cortex dorsal; D3r, porción rostral de la subregión lateral del cortex dorsal.

FIGURA 3.32



a



b

Fig. 3.33.- Eferencias (★) de la subregión D1

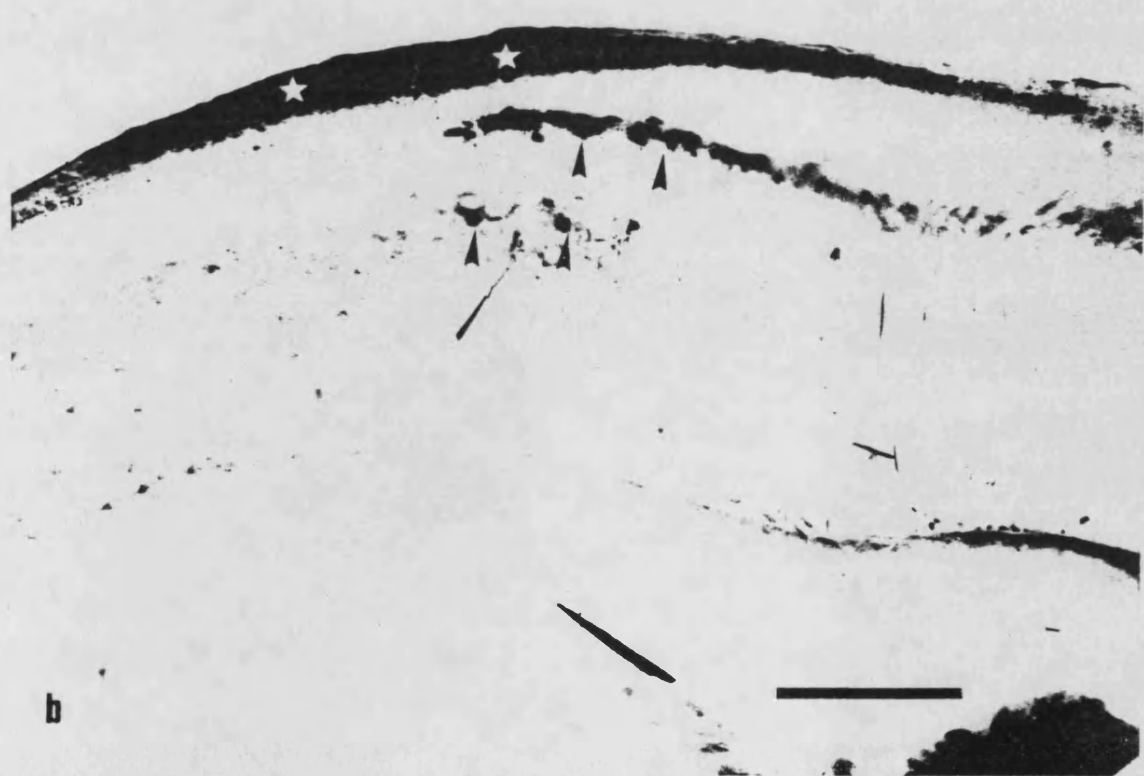
a) sobre la subregión D3 ipsilateral a nivel rostral. Barra de referencia 100 um

b) en el hemisferio contralateral sobre el cortex dorsomedial y las subregiones D1 y D3 caudal del cortex dorsal. Observese también el marcaje retrógrado (▲) en la subregión D1 y en el cortex dorsomedial. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.33



a



b

Fig. 3.34.- Esquema en el que se representan las eferencias de la subregión D2 en corte longitudinal (a) transversales (b, c, d) y en vista dorsal (e).

Abreviaturas: BOA, bulbo olfativo accesorio; BOP, bulbo olfativo principal; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; SP, septum.

FIGURA 3.34

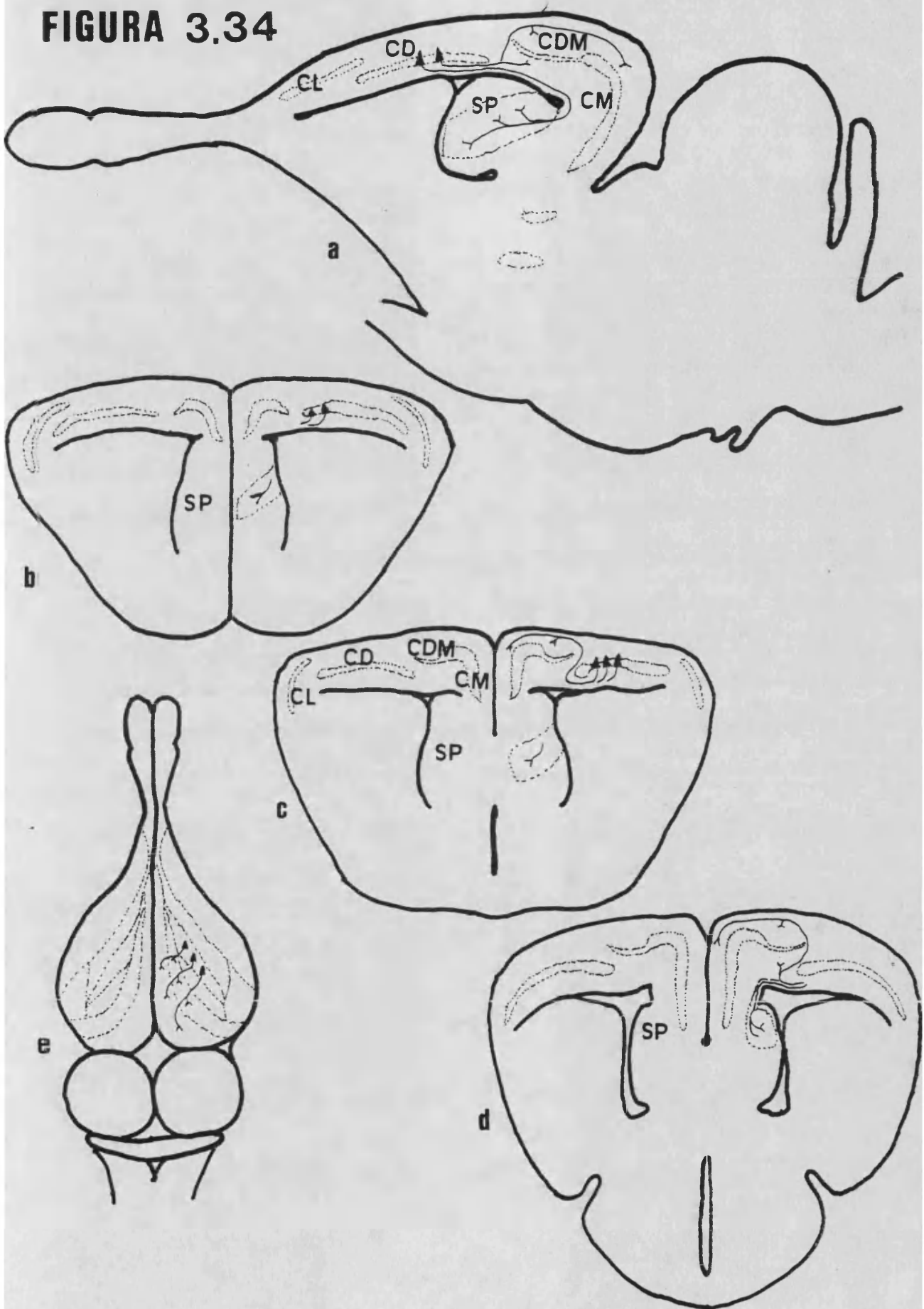
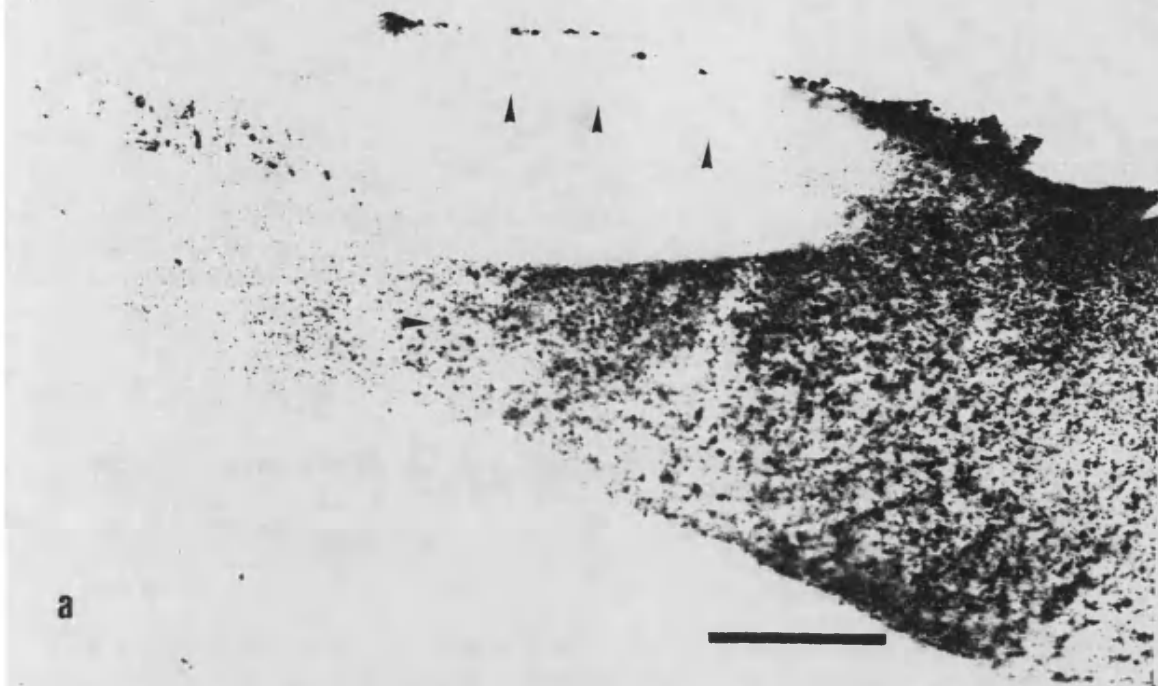


Fig. 3.35.- Marcaje anterógrado (▲) sobre el cortex dorsomedial (a) y sobre el cortex medial (b,c) tras inyección de HRP en la subregión D2.

a) eferencias sobre el cortex dorsomedial. Ocupan la totalidad de la capa plexiforme interna y una delgada banda en la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa. Barra de referencia 100 um

b y c) niveles caudales del cortex medial tras inyecciones en el cortex dorsal y en el cortex lateral (c). Observese que aparecen dos bandas, de ellas la más externa únicamente aparece cuando la inyección se restringe al cortex lateral. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.35



a



b

c

Fig. 3.36.- Desarrollo rostro-caudal de la eferencia (★) de la subregión D2 sobre la región septal. Los axones (flecha) alcanzan el septum por niveles caudales (c), a niveles intermedios ocupan la porción dorsal del septum (b) y a niveles rostrales ocupa un área central (a). Barra de referencia 300 um

FIGURA 3.36

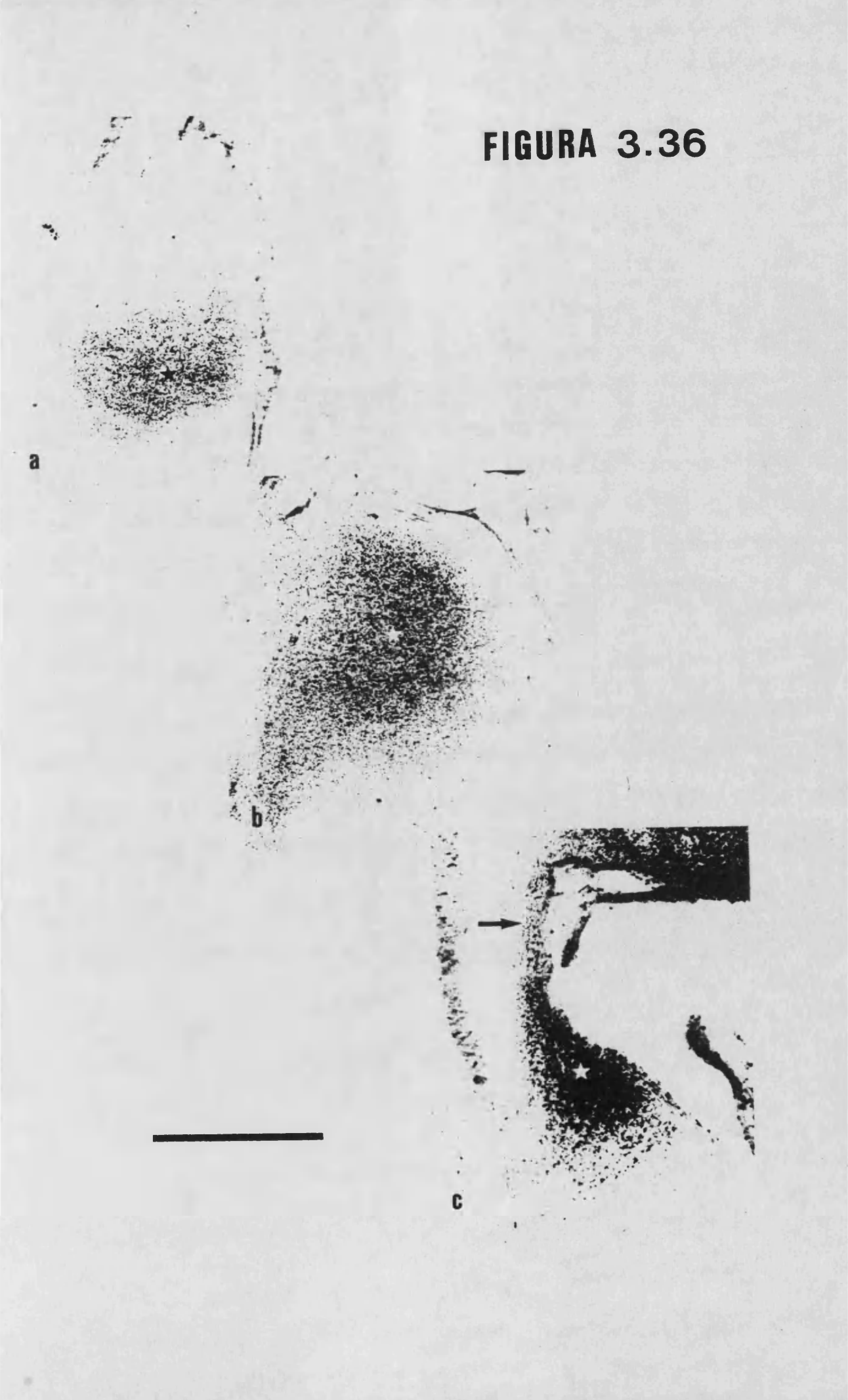


Fig. 3.37.- Esquema en el que se representan las eferencias de la porción rostral (D3r) y de la porción caudal (D3c) de la subregión lateral del cortex dorsalen corte longitudinal (a) y cortes transversales (b, c); representandose las eferencias de D3r en el hemisferio derecho y las de D3c en el hemisferio izquierdo.

Abreviaturas: BOA, bulbo olfativo accesorio; BOP, bulbo olfativo principal; CD, cortex dorsal; CDM, cortex dorsomedial; CL, cortex lateral; CM, cortex medial; D3c, porción caudal de la subregión lateral del cortex dorsal; D3r, porción rostral de la subregión lateral del cortex dorsal; NE, núcleo esférico; PDUR, porción caudal de la cresta ventricular dorsal

FIGURA 3.37

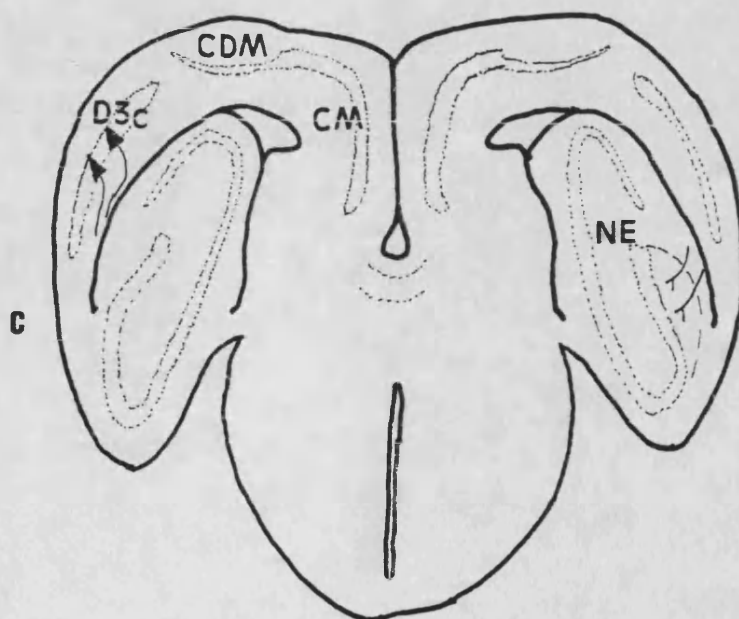
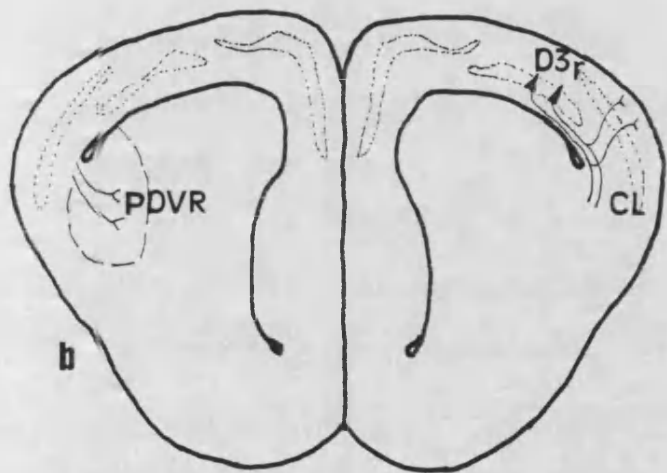
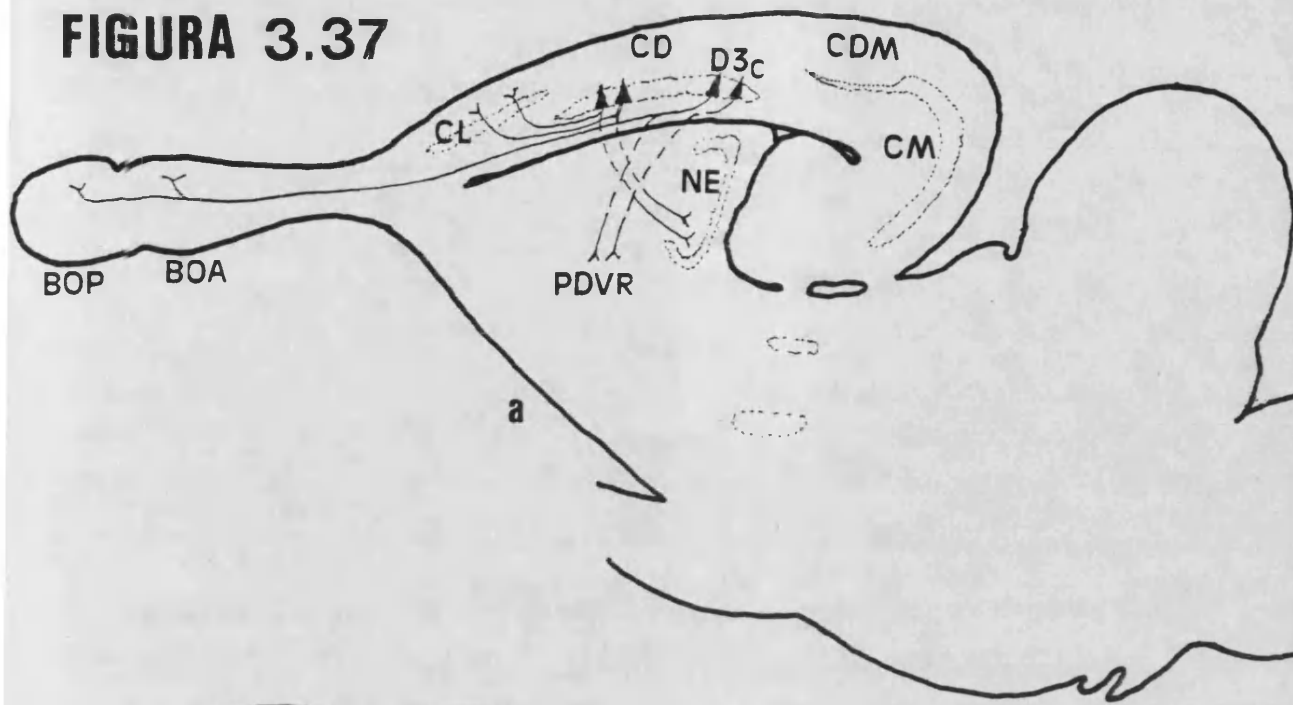


Fig. 3.38.- Proyecciones reciprocas entre el cortex lateral y la subregion D3 rostral del cortex dorsal

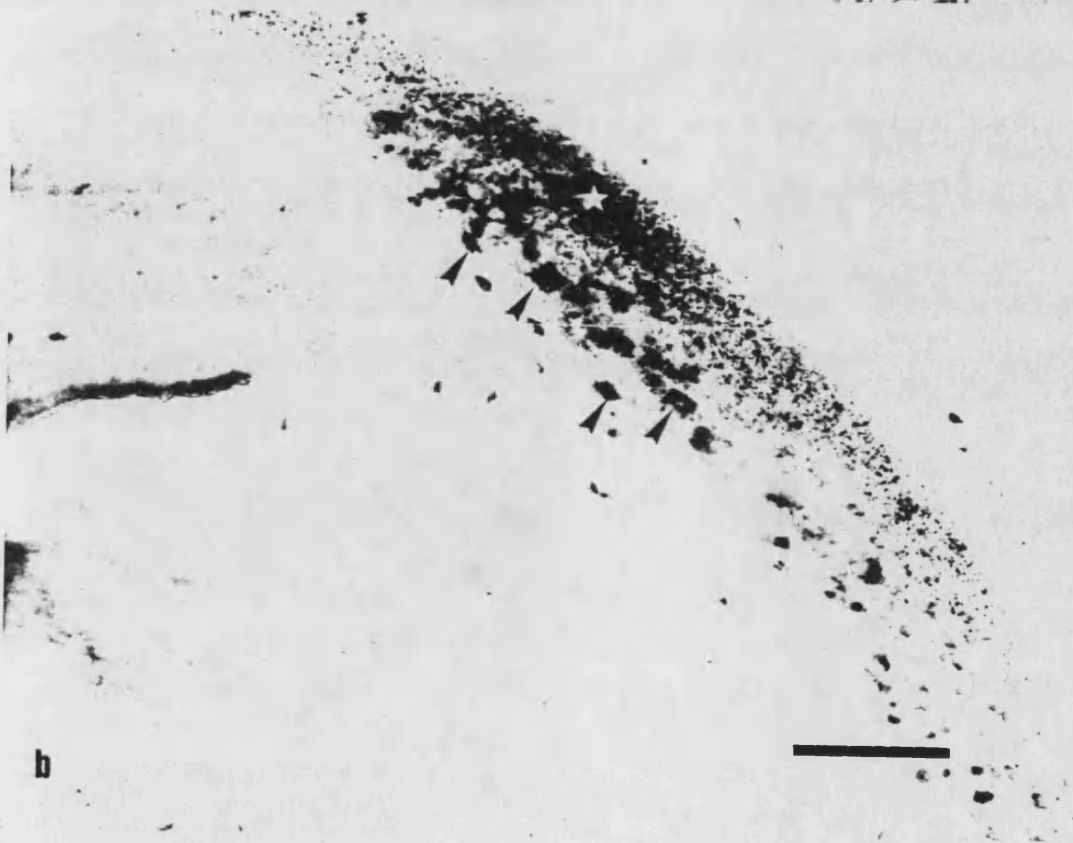
a) inyección restringida en el cortex lateral. Observese la eferencia sobre el cortex dorsal (★), el debil marcaje retrógrado en la subregion D3 (▲), y algunas fibras marcadas retrógradamente (†). Barra de referencia 100 um

b) inyección en el cortex dorsal. Observese el marcaje retrógrado (▲) y el marcaje anterógrado (★) en el cortex lateral. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.38



a



b

Fig. 3.39.- Marcaje anterógrado en la cresta ventricular dorsal (DVR) y núcleo esférico (NE) tras inyección en la subregión D3.

a) inyección masiva en el cortex dorsal. Observese que el marcaje anterógrado (★) ocupa la porción lateral del núcleo esférico. Barra de referencia 200 um

b) inyección restringida a la porción rostral del cortex dorsal. Observese la presencia de marcaje puntiforme (▲) entre los cuerpos neuronales marcados retrógradamente (†). Barra de referencia 100 um

c) inyección a nivel caudal. La eferencia ocupa la porción latero-dorsal de la porción caudal de la cresta ventricular dorsal (BDVR). Observese la presencia de fibras con engrosamientos periódicos (†). Barra de referencia 200 um

FIGURA 3.39

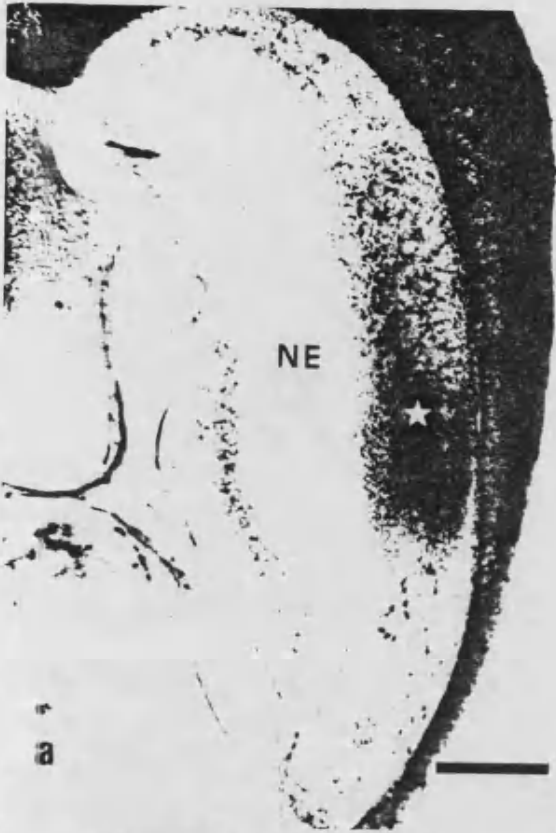


Fig. 3.40.- Marcaje retrógrado (▲) en el cortex dorsal tras inyecciones de HRP en los bulbos olfativos. El marcaje de aferencias aparece tanto tras inyecciones en el bulbo olfativo principal como accesorio.

a) marcaje retrógrado en la subregión D1. Barra de referencia 100 um

b) marcaje retrógrado en la subregión D3 caudal. Barra de referencia 100 um

FIGURA 3.40



DISCUSION

4.1.- DE LA TECNICA

4.1.1.- CONDICIONES DE INYECCION

4.1.2.- TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

4.1.3.- REVELADO DE HRP

4.2.- AFERENCIAS A LAS AREAS CORTICALES DORSOMEDIAL Y DORSAL

4.2.1.- AFERENCIA DESDE EL CORTEX MEDIAL

4.2.2.- AFERENCIA DESDE EL CORTEX LATERAL

4.2.3.- LA AFERENCIA SUBCORTICAL

4.2.4.- LA AFERENCIA TALAMICA

4.2.5.- LA AFERENCIA HIPOTALAMICA

4.2.6.- LA AFERENCIA MESENCEFALICA

4.3.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS AL CORTEX DORSAL

4.3.1.- AFERENCIA DESDE LOS NUCLEOS OLFATIVOS
ANTERIORES

4.3.2.- AFERENCIA DESDE EL NUCLEO ESFERICO

4.3.3.- AFERENCIA DESDE EL AREA TRIANGULARIS

4.4.- EFERENCIAS DESDE EL CORTEX DORSOMEDIAL

4.4.1.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX MEDIAL

4.4.2.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX DORSAL

4.4.3.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX DORSOMEDIAL

4.4.4.- EFERENCIAS SOBRE SEPTUM

4.5.- REFERENCIAS DEL CORTEX DORSAL

4.5.1.- GENERALIDADES

4.5.2.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION MEDIAL

(D1)

4.5.3.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION INTERMEDIA

(D2)

4.5.4.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION LATERAL

(D3)

4.6.- CONSIDERACIONES FINALES

La Clase Reptiles presenta un interés particular desde el punto de vista de la evolución del sistema nervioso de los vertebrados ya que de este grupo derivan las Clases: Mamíferos y Aves. No obstante, es necesario comenzar con la asunción de que el modelo de organización del sistema nervioso de los reptiles actuales es con mucho distinto del que presentaban los reptiles tronco de los que proceden los mamíferos y aves actuales; de tal modo, que estos tres grupos de vertebrados han presentado una evolución divergente e independiente entre sí.

En el orden Squamata se ha definido un sistema cortical con proyecciones intrínsecas intensamente positivas a la reacción de Timm que abarcan las áreas paleales dorsomedial y dorsal y la porción dorsal del septum (Ketelslegers, 1969; Molowny & López García, 1978). Este hecho permite establecer semejanzas entre las regiones implicadas en el mencionado sistema de proyecciones y las correspondientes regiones del hipocampo de mamíferos receptoras de las fibras musgosas las cuales presentan una marcada reacción positiva cuando se aplica el método de Timm (Timm, 1958b; Haug, 1974; Zimmer & Haug, 1978). Sin embargo, para la correcta comprensión de tal sistema, así como su eventual homologación con el hipocampo de mamíferos, es necesario establecer el modelo de conexiones de cada área implicada en este sistema Timm positivo.

El presente trabajo se centra en el estudio de las

conexiones de las áreas paleales dorsomedial y dorsal y tiene por objeto la determinación de los somas de origen de las distintas aferencias a estas zonas así como la delimitación de las zonas de eferencia de las mismas. Para ello se ha utilizado la técnica de inyección y transporte del enzima peroxidasa de rábano (HRP).

4.1.- DE LA TECNICA

El analisis de las conexiones de la corteza cerebral de los reptiles Squamata ha sido abordado únicamente con dos tipos de técnicas: lesión e impregnación argéntica selectiva de terminales y axones anterógradamente degenerados (Uoneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976, 1978; Ulinski, 1975, 1976; Ulinski & Petersson, 1981) y transporte retrógrado de HRP (Reperant, 1976; Lohman & Van Woerden Verkley, 1978; Bruce & Butler, 1984a; Martínez García et al., 1986).

La técnica de lesión y degeneración anterógrada permite delimitar las áreas de proyección de una estructura determinada, sin embargo, presenta dos limitaciones importantes: en primer lugar, es muy difícil restringir la lesión a un área determinada, sobre todo en la corteza cerebral de reptiles, por lo que en muchos casos se presenta un solapamiento con las proyecciones de las regiones vecinas; por otra parte, no permite definir la

morfología y localización de los somas neuronales responsables de una determinada proyección, lo cual puede ser problemático en la corteza cerebral de reptiles en la que cada región puede presentar una variedad de tipos neuronales distintos, los cuales potencialmente pueden dar lugar a proyecciones distintas.

El método utilizado para la realización del presente estudio fué el de inyección y transporte del enzima peroxidasa de rábano (HRP). La mencionada técnica tan sólo ha sido utilizada en su aspecto retrógrado para determinar las aferencias a las distintas regiones corticales. Sin embargo, el método permite estudiar tanto las aferencias al punto de inyección como las eferencias del mismo. De tal modo, que el enzima inyectado es incorporado por los terminales axónicos mediante un proceso de endocitosis inespecífica y por los axones dañados que pasan por el lugar de inyección y transportado retrógradamente al cuerpo neuronal que de este modo aparece marcado, o bien la HRP puede ser incorporada por el soma neuronal o las dendritas y transportado anterógradamente hasta los terminales sinápticos de las zonas de proyección del área inyectada (Hansson, 1973; La Vail & La Vail, 1974; Turner & Harris, 1974).

En el presente estudio las zonas de eferencia se presentan con un denso marcaje puntiforme entre el que se pueden observar trayectos axónicos cortos varicosidades o engrosamientos periódicos similares a botones de paso. Sin

embargo, hay que señalar que en las eferencias a larga distancia, por ejemplo las comisurales o las diencefálicas, se observa siempre una menor densidad del producto de la reacción, por lo que es posible asumir que parte de la peroxidasa inyectada se queda en la trayectoria de los axones hasta el lugar de proyección.

Por otra parte, las neuronas que incorporan la traza desde los terminales axónicos o fibras de paso y la transportan retrógradamente hasta el soma neuronal quedan marcadas por la presencia de producto de reacción en su interior, adicionalmente la HRP puede ser también transportada a los segmentos dendríticos iniciales. Estas figuras fueron particularmente frecuentes cuando se añadió dimetil sulfoxido (DMSO) o saponina a la solución de HRP inyectada, corroborando de este modo los resultados de otros autores (Keefer et al., 1976; Donoso et al., 1977).

También fué posible en muchos casos seguir la trayectoria de los axones desde el núcleo en el que se encuentran los somas neuronales marcados hasta el punto de inyección, aunque en las proximidades del mismo los axones se pierden en el seno de una maraña formada por fibras y dendritas marcadas en la zona de inyección-difusión. Asimismo, en ocasiones un fascículo sirve de vía de proyección de dos o más núcleos, lo cual dificulta el estudio de la entrada de un determinado tipo de axones a la zona de inyección.

La principal limitación de esta técnica consiste en

la incorporación del enzima por parte de axones dañados que pasan a través de la zona de inyección pero que no establecen contactos sinápticos en la misma. Este problema se puede reducir mejorando las condiciones de la operación quirúrgica o quitando aditivos de la solución de HRP, pero en ningún caso se puede obviar totalmente (Adams, 1977; Adams & Warr, 1976; Mesulam, 1982).

4.1.1.- CONDICIONES DE INYECCION

Las condiciones óptimas de inyección que permiten un buen marcaje de aferencias y eferencias y una difusión restringida son inyecciones de 20 nl para Gallotia y 10 nl para Podarcis de soluciones de HRP al 15 % en DMSO al 2 %. Las soluciones de HRP más concentradas no pueden ser administradas a través de micropipetas finas y soluciones menos concentradas no permiten un buen marcaje de estructuras neuronales. En estas condiciones de inyección se pueden obtener áreas de difusión entre 200 y 500 μ m de diámetro. Mesulam (1982) mediante inyecciones de 50 a 70 nl de HRP al 20 % obtiene diámetros de difusión de alrededor de 2 mm, sin embargo, la traza era inyectada a través de una jeringa Hamilton, por lo que la diferencia significativa entre ambos métodos puede ser debida a los posibles escapes del sistema jeringa-Hamilton-micropipeta, por una parte, y al menor daño cerebral ocasionado al administrar la HRP a través de micropipetas.

El DMSO y la saponina permiten obtener una mejor penetración del enzima al interior de las estructuras neuronales ya que su efecto tensoactivo desorganiza parcialmente la membrana celular (Keefer et al., 1976; Donoso et al., 1977).

4.1.2.- TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

En mamíferos y aves, el tiempo de supervivencia descrito como idóneo en el trazado de conexiones nerviosas oscila entre 24 y 72 horas según la distancia de las proyecciones que se pretende determinar, por otra parte el enzima comienza a ser degradado a partir del 5o día; también se ha señalado que la velocidad del transporte anterógrado es de 4 a 5 veces superior a la que tiene lugar en sentido retrógrado (La Vail & La Vail, 1974; Mesulam & Mufson, 1980; Mesulam, 1982). Sin embargo, los tiempos de supervivencia que se requieren tanto para el transporte anterógrado como para el retrógrado cuando se utiliza como modelo experimental el cerebro de reptiles son siempre notablemente superiores. Cuando se trazan conexiones del cerebro de reptiles con la técnica de HRP, tanto para el sistema nervioso central como para el periférico, los tiempos de supervivencia más ampliamente utilizados se sitúan entre los 6 y 7 días (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978; Ten Donkelaar et al., 1980; Bruce & Butler, 1984a-b).

En las experiencias previas, a tiempos de

supervivencia de alrededor de 24 horas no se pudieron observar somas marcados en el hemisferio contralateral, si bien estos estaban presentes en el ipsilateral, también se observaron, en el hemisferio contralateral, axones marcados por transporte anterógrado, lo cual es consistente con la hipótesis de una mayor velocidad para este tipo de transporte (Mesulam, 1982). Por otra parte, sólo se observó una pérdida de la actividad enzimática a partir de los 11 días de supervivencia.

La menor velocidad del transporte axónico en reptiles respecto a mamíferos y aves puede ser debida a un metabolismo más bajo derivado de la menor temperatura del medio interno.

4.1.3.- EL REVELADO DE LA HRP

Si bien los protocolos seguidos para los procesos de fijación, inclusión y corte fueron los mismos que los descritos por la literatura, en el revelado histoquímico posterior se utilizó una variante técnica que supone la utilización de tetrametil benzidina (TMB) como cromógeno y heptamolibdato amónico como estabilizante del producto de la reacción (Olucha et al., 1985a).

Este método resulta ser una variante del de Mesulam (1978) y presenta unas mejoras técnicas respecto a este. Por una parte, la estabilidad del producto de reacción posibilita que la incubación con el cromógeno pueda

realizarse a pHs más próximos al fisiológico (pH 6), lo cual evita la fuerte retracción del tejido que tiene lugar al seguir la técnica convencional la cual transcurre a pHs fuertemente ácidos (pH 3.3). Esta retracción medida en series paralelas reveladas con ambas técnicas se cifra entre el 30 y el 40 %.

Por otra parte, la utilización del heptamolibdato amónico en vez de nitroprusiato sódico como agente estabilizante evita la formación artefactual de cristales aciculares que restan calidad a las imágenes obtenidas y que en algunos casos pueden inducir a error.

Se estudió por fin la sensibilidad relativa de ambas técnicas, calculada mediante recuentos de somas neuronales retrógradamente marcados en series paralelas del mismo ejemplar reveladas con ambos métodos. Dichos recuentos muestran que la técnica utilizada en el presente estudio presenta una sensibilidad ligeramente superior a la técnica convencional de TMB con NPS. Por otra parte, en otros estudios relativos a la sensibilidad de las diversas técnicas para la demostración de HRP, ha sido ampliamente comprobado que las más eficaces son aquellas en las cuales se utiliza tetrametil benzidina como cromógeno (Mesulam & Rosene, 1979; Morrell et al., 1981; Olsson et al., 1983).

4.2.- AFERENCIAS A LAS AREAS CORTICALES DORSOMEDIAL Y DORSAL

4.2.1.- AFERENCIA DESDE EL CORTEX MEDIAL

En todos los ejemplares en los que se inyectó HRP en el cortex dorsomedial o en el cortex dorsal se observaron somas neuronales marcados en el cortex medial.

La existencia de una proyección desde el cortex medial sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal ha sido probada mediante estudios de degeneración en Tupinambis (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976) y en Ihamnophis (Ulinski, 1976) y también mediante transporte retrógrado de HRP conjugada con lectinas en Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a). Sin embargo, no ha quedado definida realmente la topografía de la proyección ni se han descrito los tipos neuronales que la originan.

Las neuronas que aparecen retrógradamente marcadas en el cortex medial se sitúan en distintas subzonas del estrato de somas según la localización del punto de inyección, de tal modo que cuando la inyección se centró en el cortex dorsomedial o en la subregión medial del cortex dorsal las neuronas marcadas en el cortex medial se localizan preferentemente en la porción vertical del mismo en los niveles próximos al punto de inyección, como ha sido referido en experiencias similares en Gekko e Iguana.

(Bruce & Butler, 1984a). Por otra parte, cuando las inyecciones se efectuaron en las subregiones intermedia o lateral del cortex dorsal las neuronas marcadas se localizaron en las porciones dorsales y ventrales del estrato de somas a niveles caudales al punto de inyección.

Los somas neuronales marcados en el cortex medial se sitúan fundamentalmente en el estrato de somas y en menor proporción en las capas plexiformes externa e interna. Es necesario puntualizar que las neuronas marcadas en la capa plexiforme interna sólo aparecen en la zona de imprecisa delimitación entre las capas plexiformes internas de las áreas corticales dorsomedial y medial; en aquellos ejemplares en los que la inyección se efectuó en el cortex dorsomedial

Las distintas formas neuronales que aparecen con producto de reacción en el estrato de somas del cortex medial han sido reunidas en cuatro grupos: granulares pequeñas, alargadas grandes, triangulares superficiales y fusiformes superficiales.

Las células granulares pequeñas corresponden, por tamaño y arborización dendrítica primaria a las neuronas de tipo m1-D (Regidor, 1977), de tipo 4 (Lacey, 1978), neuronas C1 y C2 (Wouterlood, 1981) y neuronas piramidales del cortex medial (Guirado, 1982). En todos los casos estas células presentan un soma redondeado y pequeño (alrededor de 10 μ de diámetro) del que parten una o varias dendritas apicales y basales que se ramifican en ambas capas

plexiformes; el axón es descendente y se pierde a escasa distancia del estrato de somas.

Las neuronas que han sido caracterizadas como alargadas grandes corresponden a los tipos neuronales definidos como: m1-E (Regidor, 1977), neuronas C3 y C4 (Wouterlood, 1981), neurona bipiramidal pequeña (Berbel, 1981) y neurona candelabro (Guirado, 1982) en trabajos con la técnica de Golgi. En todos los casos se ha descrito la salida desde el cuerpo neuronal de una dendrita apical que se ramifica en la capa plexiforme externa y sobre la que se observan espinas dendríticas, sin embargo este detalle no se ha observado mediante el marcaje con HRP, adicionalmente del polo basal parten una o varias dendritas que se ramifican en la capa plexiforme interna, el axón parte del polo basal del cuerpo neuronal o del tramo inicial de una dendrita basal y se pierde a escasa distancia del soma en la capa plexiforme interna. Sin embargo, también se han observado colaterales que alcanzan la capa plexiforme externa del cortex medial (Regidor, 1977) y colaterales que acaban en el cortex dorsomedial (Berbel, 1981; Martínez-Guijarro et al., 1984 b).

Las neuronas fusiformes superficiales presentan la misma forma que las de la capa plexiforme externa, no obstante, en los estudios con la técnica de Golgi las han diferenciado como tipos neuronales distintos, este tipo neuronal se corresponde con los tipos: m1-A (Regidor, 1977), clase 1 (Lacey, 1978), células horizontales de

plexiforme externa (Berbel, 1981) y células T1 (Wouterlood, 1981) mediante estudios con Golgi. Este tipo neuronal presenta un soma fusiforme orientado paralelamente al estrato de somas y con dos ramas dendríticas que parten de los polos de la célula que se extienden pegadas al límite externo del mencionado estrato, mediante marcaje con HRP tras inyección en el propio cortex medial se ha observado que el axón atraviesa el estrato de somas hasta llegar a la capa plexiforme interna donde se incurva 180° y vuelve a ascender hasta llegar a la capa plexiforme externa donde se pierde en una banda de eferencia sobre el propio cortex medial (Poch, comunicación personal). En imágenes de Golgi se ha descrito una trayectoria similar para una de las dendritas de este tipo neuronal (Wouterlood, 1981).

El tipo neuronal definido como triangular superficial corresponde a las formas: m1-B (Regidor, 1977), células T2 (Wouterlood, 1981) y neuronas triangulares del borde superficial (Guirado, 1982). En las descripciones con la técnica de Golgi este tipo neuronal se presenta con un soma triangular uno de cuyos vértices se dirige al interior del estrato granular del que parte una dendrita basal que acaba en la capa plexiforme interna, de los otros dos vértices parten sendas dendritas que se ramifican en la capa plexiforme externa; el axón es descendente y se pierde en la capa plexiforme interna.

En algunos ejemplares en los que el enzima se inyectó en el cortex dorsomedial con cierta difusión al

cortex medial se observaron algunas neuronas marcadas en la capa plexiforme interna en la zona limitante entre ambas áreas paleales. Estas neuronas se corresponden con los tipos neuronales ml-H (Regidor, 1977), tipo estrellado de plexiforme interna (Berbel, 1981) y al tipo S2 (Wouterlood, 1981). El axón de estas neuronas es ascendente y se pierde en el estrato de somas del cortex medial. En algunos casos, mediante inyección de HRP se ha observado que el axón de estas neuronas llega a atravesar el estrato de somas ramificandose en la capa plexiforme externa.

La comparación de los tipos neuronales marcados mediante HRP con las figuras obtenidas mediante técnicas de Golgi resulta sencillo cuando se trata de ejemplares pertenecientes al Suborden Lacertilia. Mientras que en el Suborden Ofidia los tipos morfológicos son ligeramente distintos, en este Suborden el tipo neuronal predominante no es el granular o alargado, sino el denominado "célula candelabro" (Ulinski, 1974; Guirado, 1982).

Las neuronas superficiales del estrato de somas y las de la capa plexiforme externa se pueden localizar a lo largo de toda la extensión del cortex medial tanto en inyecciones en el cortex dorsomedial como en el cortex dorsal. En algunos casos se ha señalado que los axones de estas neuronas se pierden en el seno de una banda de eferencia localizado en la capa plexiforme externa del cortex medial, dicha banda se continua con el cortex dorsomedial y algunas porciones del cortex dorsal (Poch et

al., 1985). Las zonas en las cuales aparece este marcaje son claramente Timm negativas, por otra parte estos mismos tipos neuronales han sido descritos como GABAérgicos (Schwerdtfeger y López García, 1986), por lo que estas neuronas podrían ser las responsables de una proyección inhibitoria sobre algunas áreas envueltas en el sistema Timm positivo.

Los tipos neuronales que más frecuentemente aparecían marcados tras inyecciones de HRP en las áreas corticales dorsomedial o dorsal fueron el granular pequeño y el alargado grande los cuales aparecen agrupados o bien en la porción vertical, cuando la inyección se efectúa en el cortex dorsomedial, o bien en las porciones dorsal y ventral cuando esta se centra en el cortex dorsal. Adicionalmente, cuando se inyecta HRP en la porción vertical del cortex medial se ha observado un marcaje de eferencias en el cortex dorsomedial mientras que cuando la inyección se efectúa en porción dorsal del cortex medial el marcaje anterógrado se localiza en las subregiones intermedia o lateral del cortex dorsal (Poch et al., 1985).

Cuando se aplica el método de Timm para la detección de metales pesados (fundamentalmente Zinc) en el cerebro de reptiles Squamata se definen una serie de regiones corticales y septales intensamente positivas a la mencionada técnica, dichas áreas abarcan las capas plexiformes internas de las áreas paleales dorsomedial y dorsal y los 2/3 internos de las capas plexiformes externas

de las mismas regiones, así como la porción dorsal del septum precomisural (Ketelslegers, 1968; Molowny y López García, 1978; López García et al., 1983a); estas regiones Timm positivas se corresponden con las áreas de marcaje anterógrado cuando se inyecta HRP en el cortex medial. Como el tipo neuronal que mayoritariamente aparece con marcaje retrógrado es el granular pequeño posiblemente sean estas las neuronas responsables de esta proyección Timm positiva.

En el hipocampo de mamíferos se ha descrito un sistema intrínseco de proyecciones: "las fibras musgosas". Dicha proyección se origina en las células granulares de la fascia dentada cuyos axones dan lugar a contactos sinápticos en el estratum lucidum del campo CA3 y sobre las dendritas apicales y basales de las neuronas del campo CA4 (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blackstad et al., 1970; Amaral, 1978; Swanson et al., 1978). Esta zona de proyección de las fibras musgosas se caracteriza por presentar una reacción intensamente positiva cuando se aplica el método de Timm (Timm, 1958; Haug, 1974).

Las fibras musgosas dan lugar a terminales axónicos grandes e irregulares con vesículas redondeadas estos terminales dan lugar a contactos sinápticos asimétricos sobre las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA3 y las pirámides modificadas de CA4 (Blackstad y Kjarheim, 1961; Hamlyn, 1962); en ellos el precipitado de la reacción de Timm se presenta en el interior de las vesículas sinápticas (Pérez Clausell y Danscher, 1985). Del

mismo modo, los terminales axónicos Timm positivos de reptiles dan lugar a contactos sinápticos asimétricos sobre las espinas dendríticas de las neuronas bipiramidales de las áreas corticales dorsomedial y dorsal en los que el precipitado de la reacción de Timm se presenta en el interior de vesículas esféricas (López García et al., 1983b; Martínez Guijarro et al., 1984a).

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, el cortex medial de reptiles Squamata es perfectamente comparable con la fascia dentada del hipocampo de mamíferos. Sin embargo, es necesario puntualizar algunos extremos al respecto de esta posible homología.

En primer lugar, en el cortex medial existen varios tipos neuronales que dan lugar a eferencias citoquímica y topográficamente distintas, como acaba de ser demostrado, mientras que en la fascia dentada prácticamente sólo existe un tipo neuronal de proyección: las células granulares.

Por otra parte, algunas proyecciones del cortex medial no se presentan en el restringido sistema de las fibras musgosas, tal es el caso de la proyección bilateral del cortex medial sobre el septum dorsal (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1975; Poch et al., 1985). Se puede concluir, sin embargo, que en el cortex medial existen varios sistemas de los cuales sólo uno es homologable al sistema de fibras musgosas que se origina en la fascia dentada del hipocampo de mamíferos.

4.2.2.- AFERENCIA DESDE EL CORTEX LATERAL

En el cortex lateral se observó la constante presencia de somas neuronales marcados tanto en los casos en los que las inyecciones afectaron al cortex dorsomedial como en aquellos en los que esta se centró en cualquiera de las subregiones del cortex dorsal. Esta proyección ha sido comprobada mediante transporte anterógrado tras inyecciones en el cortex lateral.

Las neuronas que aparecen marcadas se localizan siempre en la subregión dorsal del cortex lateral (L1) (Ebbesson & Voneida, 1969) y se presentan en un mayor número cuando las inyecciones se centran en las subregiones D2 y D3 del cortex dorsal que cuando se efectúan en el cortex dorsomedial o en la subregión medial. Dichas neuronas presentan una morfología entre fusiforme y triangular que corresponde posiblemente al tipo IA de las figuras de Golgi (Regidor, 1977).

El marcaje retrógrado cuando las inyecciones se efectúan en el cortex dorsomedial se presenta fundamentalmente en neuronas situadas rostralmente respecto al punto de inyección mientras que cuando estas se centran en el cortex dorsal las mencionadas neuronas se localizaron a los mismos niveles o incluso a niveles caudales. Estos hechos parecen indicar que los axones se dirigen en sus primeros tramos en sentido medial o medio-rostral dando lugar a la proyección sobre el cortex dorsal para

incurvarse posteriormente tomando un sentido medio-caudal sobre el cortex dorsomedial. Estos resultados estan de acuerdo con los aportados por otros autores mediante degeneración anterógrada (Lohman y Mentink, 1972; Ulinski, 1976; Ulinski y Petersson, 1981).

Cuando se efectuaron inyecciones de HRP en el cortex lateral se observó un marcaje anterógrado diferencial sobre las áreas paleales dorsomedial y dorsal, de tal modo que mientras en el cortex dorsal el marcaje de terminales ocupa la mitad externa de la capa plexiforme externa (es decir la zona Timm negativa) de la subregión D2 y D3, en la subregión D1 y en el cortex dorsomedial sólo se observaron algunos axones en la zona mas superficial que presentaban engrosamientos periódicos similares a botones de paso; dicha estructura ha sido detectada en esta misma localización mediante microscopia electrónica (Martínez Guijarro, 1985).

La existencia de una proyección desde el cortex lateral sobre las áreas paleales dorsomedial y dorsal no ha sido comentada en ninguno de los estudios sobre conexiones intracorticales con técnicas de degeneración en los que unicamente se señala la proyección sobre el cortex medial (Lohman y Mentink, 1972; Butler, 1976, 1980; Ulinski, 1976; Ulinski y Petersson; 1980). Sin embargo, en todos los casos se observa el paso de los axones a traves de las zonas superficiales de las áreas paleales dorsomedial y dorsal, por lo que la degeneración de los mismos podria enmascarar

la presencia de terminales en las mencionadas zonas.

Las zonas ocupadas por la proyección lateral en las áreas paleales medial y dorsomedial son negativas a las técnicas histoquímicas de Timm (López García et al., 1983a) y de detección de Acetil-colinesterasas (Tineo comunicación personal). Sin embargo, la banda de referencia sobre el cortex dorsal es positiva para esta última técnica, por otra parte, esta zona también está ocupada por la referencia procedente del cortex dorsomedial por lo que tal positividad podría deberse a esta última proyección.

El cortex lateral recibe una proyección masiva del bulbo olfativo principal (Halpern, 1958, Ulinski y Petersson, 1981) y a su vez proyecta masivamente sobre el tercio externo de la capa plexiforme externa del cortex medial (Lohman y Mentink, 1972; Butler, 1976, 1980; Ulinski, 1976; Ulinski y Petersson 1981; Martínez García et al., 1986); ya que el cortex medial es considerado, al menos en parte, homólogo de la fascia dentada (como acaba de ser expuesto en el apartado anterior), su referencia desde el cortex lateral sería comparable a la proyección del área entorrinal medial sobre la fascia dentada a través de la vía perforante.

Sin embargo, la fascia dentada no es la única estructura hipocámpica que recibe proyección desde el área entorrinal, de tal modo que la porción lateral de este área proyecta al stratum lacunosum-moleculare del asta de Ammon (Andersen et al., 1971; Hjorth-Simonsen, 1976; Steward,

1976; Habets et al., 1980; Ruth et al., 1982). Como se ha observado previamente también la proyección del cortex lateral sobre las áreas paleales dorsomedial y dorsal termina en la porción mas superficial del árbol dendritico apical de las neuronas bpiramidales, con lo que esta proyección seria funcionalmente similar a la descrita en mamíferos y tendria, por tanto, justificación evolutiva.

Como se ha señalado anteriormente, en mamíferos existe una clara segregación de las proyecciones desde el cortex entorrinal sobre el hipocampo (porción lateral sobre el asta de Ammon y porción medial sobre la fascia dentada). Tal segregación no ha sido observada en la subregion dorsal del cortex lateral (L1), sin embargo, la banda de eferencia sobre el cortex dorsal se interrumpe bruscamente cuando aparece el cortex dorsomedial en el que solo se observan unas pocas fibras que se continuan con la banda del cortex medial. Este hecho, unido a la heterogeneidad de la subregión observada en los estudios con técnicas de Golgi permiten suponer que las neuronas responsables de la proyección sobre el cortex dorsal sean distintas de las que dan lugar a la proyección sobre las áreas corticales dorsomedial y medial.

4.2.3.- LAS AFERENCIAS SUBCORTICALES

Los núcleos del lecho del fascículo prosencefálico medial (bMFB) y de la comisura anterior (bCA) y la porción

vertical del núcleo de la banda diagonal aparecen con un escaso número de neuronas marcadas tras inyecciones de HRP en las áreas corticales dorsomedial y dorsal. Es necesario señalar que en muchos casos la asignación de alguno de los somas marcados a alguno de estos tres núcleos resultó sumamente difícil debido fundamentalmente a que no existe una delimitación clara entre ellos; esta dificultad es mucho más evidente en cortes longitudinales en los cuales se observa una continuidad entre estos y el núcleo preóptico.

La existencia de una proyección subcortical de este tipo sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal solo ha sido observada en Gekko e Iguana (Bruce y Butler, 1984a) tras inyecciones de HRP en el cortex dorsal pero no en el cortex dorsomedial. Esto último está en aparente contradicción con lo observado en el presente estudio ya que se observaron neuronas marcadas en el núcleo de la comisura anterior incluso en los casos de inyecciones restringidas al cortex dorsomedial, los otros núcleos no siempre presentan neuronas retrógradamente marcadas.

En tortugas, mediante inyecciones de HRP en el cortex general (que ocupa la misma localización topográfica que el cortex dorsal de Squamata) también se han observado somas neuronales retrógradamente marcados en el telencéfalo basal en una localización similar al núcleo del lecho del fascículo prosencefálico medial (Ouimet et al., 1985).

Es posible que el escaso marcaje retrógrado de las

neuronas localizadas en estos núcleos cuando la inyección se efectúa en el cortex dorsomedial sea debido a la rotura de axones de paso hacia el cortex dorsal, no obstante, esta escasez también se observa cuando la inyección se efectúa en esta última región cortical. La baja proporción de somas marcados podría ser interpretada como resultado de una aferencia no sobre las neuronas de proyección sino posiblemente sobre sus interneuronas. De hecho en mamíferos parte de la proyección del complejo septum medial-banda diagonal se efectúa sobre neuronas GABA-érgicas del hipocampo (Schwerdtfeger, 1986).

En mamíferos, el complejo septum medial-banda diagonal parece ser el sistema generador de un ritmo hipocámpico de baja frecuencia: el ritmo theta (Buño y García Austt, 1979). Según los datos anatómicos este ritmo se manifiesta por una inervación doble (colinérgica y no colinérgica) de las neuronas septales sobre la fascia dentada y campo CA3 del hipocampo y se efectuaría tanto sobre las neuronas de proyección como sobre interneuronas (Cherubini et al., 1982). Los datos electrofisiológicos a este respecto sobre reptiles son muy fragmentarios, no obstante, un ritmo theta similar al existente en mamíferos ha sido detectado en el cortex general de tortugas (Belekhova, 1979).

4.2.4.- LA AFERENCIA TALAMICA

El núcleo dorsolateral anterior (n.d.l.a.) da lugar a la única proyección talámica sobre el cortex dorsal y posiblemente también sobre el cortex dorsomedial en las dos especies de Lacertidos estudiadas. Este marcaje fué siempre bilateral, aunque el número de neuronas marcadas ipsilateralmente fué siempre superior a las marcadas contralateralmente. Al mismo tiempo se ha observado la existencia de una eferencia desde el cortex dorsal sobre este núcleo talámico, lo cual va a ser discutido en el apartado de eferencias de esta región cortical (apartado 4.6.1).

Según los resultados observados el n.d.l.a. presenta una clara parcelación, de tal modo que cuando la inyección afecta al cortex dorsomedial con difusión al cortex medial los somas neuronales marcados se localizan fundamentalmente en la pars parvocellularis. Mientras que, cuando la inyección se centra en las subregiones D2 o D3 este marcaje se concentra en la pars magnocellularis. Por otra parte, cuando la inyección se restringió al cortex dorsomedial o con difusión a la subregión D1 se observo un escaso marcaje de este núcleo talámico.

Estos resultados concuerdan con los observados en Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a). Sin embargo, en esos ejemplares se señala que la proyección desde n.d.l.a. incide sobre todas las regiones corticales, incluyendo el

cortex lateral (Bruce & Butler, 1984a); mientras que en Tupinambis mediante técnicas de degeneración no se observaron campos de terminales ni en el cortex lateral, ni en el cortex dorsomedial (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978). En las dos especies estudiadas cuando la inyección afectó únicamente al cortex dorsomedial se observaron muy pocos somas neuronales marcados en esta región talámica, incluso en un ejemplar no se observó marcaje retrógrado. Al mismo tiempo, en alguno de estos ejemplares fué posible el seguimiento de alguno de los axones procedentes del n.d.l.a. hasta su entrada en corteza cerebral, debido a su grueso calibre. Dicho axón, al llegar al cortex dorsomedial a través de alveus se incurva dorsalmente atravesando la capa plexiforme interna, el estrato de somas y la capa plexiforme externa hasta llegar a la zona Timm negativa, donde se invurva de nuevo para alcanzar la misma capa del cortex dorsal. Por ello, aún cuando es posible la existencia de una debil proyección desde este núcleo talámico sobre el cortex dorsomedial lo más probable sea que el marcaje retrógrado observado sea debido a la interrupción de fibras de paso que acaban en el cortex dorsal.

Los datos obtenidos en reptiles Squamata y observados también en aves (Benowitz & Karten, 1976), contrastan con los aportados en Quelonios en los que el cortex general, ampliamente comparado con el cortex dorsal, recibe su principal proyección talámica desde el núcleo

geniculado lateral, y no desde los núcleos anteriores (Hall & Ebner, 1970; Belekhova, 1979).

Por otro lado, la comparación con las aferencias talámicas sobre el hipocampo de mamíferos resultan más difíciles de interpretar; de tal modo que mientras en reptiles Squamata la única aferencia talámica a la corteza cerebral tiene su origen en el n.d.l.a., en mamíferos son varios los núcleos que proyectan al hipocampo: núcleo periventricular, paratenial, reuniens, antero-dorsal y anteromedial; de ellos, únicamente el núcleo reuniens presenta una proyección bilateral (Domesick, 1972; Shipley & Sorensen, 1975; Henkerham, 1978; Wyss et al., 1979). Por otra parte, mientras la proyección desde el núcleo reuniens se restringe a la región subicular y campo CA1 no ha sido estudiado el modo de terminación de los restantes núcleos talámicos.

En anfibios, por otra parte, los núcleos anteriores del tálamo proyectan bilateralmente a las áreas paleales medial y dorsal (Neary, 1984; Wicht & Himstedt, 1986). Las fibras que dan lugar a esta proyección, al igual que ocurre en los reptiles estudiados, utilizan el fascículo prosencefálico medial (MFB) y la comisura anterior.

Los núcleos anteriores talámicos en mamíferos pertenecen al denominado circuito de Papez (Papez, 1937), el cual presenta un flujo cíclico de la información entre los citados núcleos anteriores, los cuerpos mamilares, el gyrus cinguli, el área entorrinal y el hipocampo, que en

principio se postulo ser el sustrato morfológico de la emoción, aunque esta hipótesis ha sido ampliamente cuestionada. Por otra parte, los núcleos anteriores junto con el núcleo reuniens no reciben información sensorial primaria o unimodal (Henkerham, 1978). Del mismo modo, en reptiles Squamata el núcleo dorsolateral anterior recibe aferencias talámicas inespecificas, aunque tambien sensoriales indirectas a través de la medula espinal y el torus semicircularis (Hoogland 1981, 1982) las cuales podrian ser la entrada de información sensorial no olfativa al sistema límbico. Esta hipótesis viene reforzada por el hecho de que en anfibios los núcleos anteriores talámicos reciben información visual (Wicht & Himstedt, 1986).

4.2.5.- LA AFERENCIA HIPOTALAMICA

La proyección hipotalámica sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal tiene su origen en los núcleos mamilares, concretamente en el núcleo mamilar lateral y en el núcleo supramamilar. Este último núcleo no ha sido referido como tal en ninguno de los trabajos referentes a la citoarquitectura de la zona, de tal modo que únicamente han sido mencionados como pertenecientes a los cuerpos mamilares, los núcleos mamilares mediales y los laterales (Campos Ortega, 1971; Cruce, 1974; Quiroga, 1979; Subhedar & Rama-Krishna, 1984); sin embargo, la constante presencia de algunas neuronas marcadas en

posición dorsal respecto a la decusación supramamilar tras inyecciones en las distintas subregiones de la corteza cerebral indica claramente que estas neuronas son distintas de las pertenecientes al núcleo periventricular suprayacente.

Por otra parte, mientras el núcleo supramamilar origina una proyección bilateral, el mamilar lateral da lugar a una aferencia estrictamente ipsilateral, el número de neuronas marcadas en este núcleo es, en cambio muy superior al observado en el supramamilar.

La existencia de una aferencia desde los cuerpos mamilares a la corteza cerebral no ha sido referida en Quelonios (Quimet et al., 1985), pero si en otros reptiles Squamata tales como Tupinambis (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978), Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a). En todos los casos esta proyección ha sido definida mediante transporte retrógrado de HRP. Sin embargo, mientras en Tupinambis se señala que la proyección mamilar es bilateral e incide únicamente sobre el cortex dorsomedial, en Gekko e Iguana el marcaje retrógrado fué observado únicamente en el hipotálamo ipsilateral, tras inyecciones en cada una de las áreas corticales incluyendo al cortex lateral. La existencia de una proyección doble (ipsilateral desde el mamilar lateral y bilateral desde el supramamilar) explicaría las discrepancias iniciales al respecto.

Un hecho destacable es que en aves también se ha

detectado una proyección mamilar sobre la corteza cerebral (Benowitz & Karten, 1976; Berk & Hawkin, 1985).

En mamíferos, los cuerpos mamilares han sido incluidos dentro del denominado circuito de Papez (Papez, 1937). Sin embargo, la caracterización de la proyección sobre el hipocampo no fue observada hasta la utilización de métodos de transporte de trazadores (Segal & Landis, 1974; Pasquier & Reinoso, 1976, 1978; Amaral & Cowan, 1980; Wyss et al., 1980). Esta proyección presenta dos campos de terminales axónicos sobre la formación hipocámpica: en la fascia dentada y en el extremo subicular del campo CA3, donde da lugar a sinapsis asimétricas típicamente excitadoras (Dent et al., 1983; Stubfield & Cowan, 1984).

El significado funcional de esta proyección hipotálamo-hipocámpica no ha sido determinada con exactitud. La estimulación del núcleo supramamilar de mamíferos evoca una inhibición de las neuronas granulares de la fascia dentada (Segal, 1979). Este hecho contrasta con los estudios de microscopía electrónica señalados anteriormente. Buzsaki (1984) lo explica sobre la posibilidad de que la proyección mamilar se efectue sobre interneuronas inhibitoras. Un hecho anatómico que apoya la anterior hipótesis es el escaso número de neuronas retrógradamente marcadas tanto en mamíferos como en aves y reptiles, sobre todo si se comparan con las proyecciones cortico-corticales en Squamata o intrahipocámpicas en mamíferos.

4.2.6.- LA AFERENCIA ROMBOENCEFALICA

El núcleo del rafe superior constituye el único centro romboencefálico en el que se han detectado neuronas retrógradamente marcadas tras inyecciones de HRP en las áreas paleales dorsomedial y dorsal. Estas neuronas se localizan tanto en las dos agrupaciones centrales de la línea media como en una localización excéntrica respecto a las mismas. Es posible por otra parte, que exista más de un tipo neuronal que contribuya a esta proyección.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los aportados en otras especies de reptiles Squamata con la misma técnica (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978; Bruce & Butler, 1984a). Sin embargo, en ninguno de los trabajos previos se ha descrito el curso de los axones desde el tronco del encéfalo hasta la corteza cerebral. En las dos especies de reptiles estudiadas las fibras que se originan en este núcleo presentan un grueso calibre por lo que es posible seguirlas incluso en el interior de las bandas de eferencias, hasta los lugares de inyección.

La característica más notable de la trayectoria de esta proyección es que la mayor parte de axones presentan una trayectoria inicial a través de la mitad contralateral del tronco del encéfalo hasta alcanzar los cuerpos mamilares para pasar al diencéfalo ipsilateral a través de

la decusación supramamilar integrándose posteriormente en el fascículo prosencefálico medial (MFB). Mientras que unos pocos llegan a los cuerpos mamilares a través del tronco cerebral ipsilateral reuniéndose con los anteriores en la decusación supramamilar. Es también de destacar la dispersión de los axones en su entrada a la corteza cerebral, en la que es frecuente la emisión de colaterales axónicas; este hecho junto con la intensidad con la que los somas neuronales incorporan HRP parecen indicar que la proyección no es puntual sino dispersa.

Una proyección similar con origen en el núcleo del rafe ha sido descrita tanto sobre el cortex general de Quelonios (Quimet et al., 1985) como sobre el hipocampo de mamíferos (Segal & Landis, 1974; Pasquier & Reinoso, 1977, 1978; Wyss et al., 1979).

Las neuronas del núcleo del rafe han sido identificadas como serotoninérgicas tanto en reptiles Squamata (Volters et al., 1979; Hoogland et al., 1984) como en Quelonios (Parent & Poirier, 1971; Parent et al., 1981; Veda et al., 1983; Quimet et al., 1985) o mamíferos (Moore & Halaris, 1975).

En mamíferos, el núcleo del rafe superior regula la actividad global del hipocampo, cuya base anatómica es posiblemente la dispersión de sus terminales axónicas (Moore & Halaris, 1975). Tal dispersión también ha sido postulada para esta proyección en Gallotia y Podarcis, por lo que su acción sobre la corteza cerebral podría ser

similar. Por otra parte, se ha demostrado que los núcleos del rafe de mamíferos regulan el ritmo Tetha, la termorregulación y la primera fase del sueño, algunos aspectos emotivos y es una de las vías de entrada de información polisensorial indirecta al hipocampo (Gray, 1977; Winocur, 1980; Werner & Bienek, 1985). Una función similar de este núcleo tendría una gran importancia en la fisiología de reptiles sobre todo en lo referente a termorregulación y sueño, ya que estos animales regulan su temperatura corporal mediante el comportamiento y cuando esta desciende por debajo de determinados límites el animal se aletarga.

No se han observado en las dos especies estudiadas somas neuronales marcadas en localizaciones tales como área ventral tegmental, substancia nigra o locus coeruleus. Sin embargo, se ha observado la presencia de neuronas marcadas en este último núcleo en Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a). En algunos ejemplares de Podarcis también han sido observadas algunas neuronas marcadas, pero en estos casos las inyecciones afectaron tanto al cortex dorsal como a los núcleos olfativos anteriores o al espesamiento paleal. Los bulbos olfativos principal y accesorio en reptiles (Halpern, 1976) y mamíferos (Price & Powell, 1977). Adicionalmente, también se ha observado la presencia de somas neuronales marcadas en esta formación tras inyecciones de HRP en bulbo olfativo principal (Amiguet, comunicación personal).

4.3.- AFERENCIAS EXCLUSIVAS AL CORTEX DORSAL

4.3.1.- AFERENCIAS DESDE EL NÚCLEO ESFÉRICO

Las aferencias exclusivas al cortex dorsal se observaron fundamentalmente cuando las inyecciones de HRP fueron efectuadas en las porciones laterales y rostrales de esta región cortical. Se trata de los núcleos olfativos anteriores, el núcleo esférico y el área triangularis, las dos primeras aferencias presentan una naturaleza olfativa, mientras que la de la tercera no ha sido especificada hasta el momento.

4.3.1.- AFERENCIA DESDE LOS NÚCLEOS OLFATIVOS ANTERIORES

Se ha observado en el proceso experimental que las aferencias desde los núcleos olfativos anteriores sobre el cortex dorsal abarcan fundamentalmente las porciones rostrales de la subregión D3 siendo dos los subnúcleos responsables de tal proyección, uno de localización dorsal y otro situado periventricularmente. Tales aferencias no han sido descritas en otras especies de reptiles.

Los núcleos olfativos anteriores reciben proyecciones desde los bulbos olfativos principal y accesorio en reptiles (Halpern, 1976) y mamíferos (Price & Powell, 1977). Adicionalmente, también se ha observado la presencia de somas neuronales marcados en esta formación tras inyecciones de HRP en bulbo olfativo principal (Amiguet, comunicación personal).

4.3.2.- AFERENCIAS DESDE EL NUCLEO ESFERICO

Al igual que ocurre con los núcleos olfativos anteriores, la aferencia del núcleo esférico se observó únicamente cuando las inyecciones de HRP se efectuaron en la porción caudal de D3. Generalmente, estas inyecciones presentaron difusión al cortex lateral, sin embargo, tras inyecciones restringidas en esta última región cortical no se observó marcaje retrógrado en el núcleo esférico, como previamente había sido señalado (Martínez García et al., 1986); en otros estudios, en cambio, esta proyección ha sido atribuida al cortex lateral (Bruce & Butler, 1984a).

El núcleo esférico recibe una proyección desde el bulbo olfativo accesorio (Goldby & Gamble, 1957; Halpern, 1976), la cual origina la hipertrofia del núcleo. El bulbo olfativo accesorio, a su vez, recibe información desde el órgano vomero-nasal. Este hecho permite comparar al núcleo esférico con el complejo amigdalino, y la proyección del mismo sobre el cortex dorsal puede representar una vía de entrada de la información olfativa accesorio a la corteza cerebral.

4.3.3.- AFERENCIA DESDE EL AREA TRIANGULARIS

Esta aferencia fue atribuida en principio al cortex lateral (Martínez García et al., 1986), sin embargo,

mientras el número de neuronas marcadas tras inyección de HRP en esta área cortical fué muy bajo, la frecuencia de las mismas aumenta notablemente cuando las inyecciones se efectuaron en D3.

La naturaleza de este núcleo y su eventual comparación con los del hipotálamo de mamíferos no ha sido determinada en reptiles, el único dato disponible se refiere a su eferencia sobre el núcleo dorsomedial del tálamo, el cual a su vez esta envuelto en la integración de información de distintas modalidades (Hoogland, 1982).

Cuando las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsomedial las áreas de marcaje anterógrado se localizaron exclusivamente en la corteza cerebral y septum. Todas las eferencias de esta región cortical son, por otra parte, bilaterales y ocupan las mismas zonas en ambos hemisferios.

Se ha observado marcaje anterógrado en el cortex medial, cortex dorsal, septum e incluso en el propio cortex dorsomedial. Dichas marcas ocupan zonas o bandas bien definidas. Estas mismas bandas presentan una reacción intensamente positiva cuando se aplica algún método histoquímico para la detección de acetil colinesterasa; del mismo modo, también presentan reacción positiva a esta enzima las neuronas del estrato granular y la capa plexiforme interna de esta región cortical (Tinsley et al., 1982, 1987). Al mismo tiempo, todas las zonas de proyección de las neuronas piramidales de los campos CA3 y CA4 también aparecen intensamente marcadas cuando se aplica

4.4.- REFERENCIAS DEL CORTEX DORSOMEDIAL (Blackstad, 1964;

Sanger-Jensen, 1972).

El transporte anterógrado de HRP desde los somas neuronales situados en el lugar de inyección hasta sus terminales axónicos permite definir las áreas de proyección de la zona inyectada. En las mencionadas áreas, el producto de reacción se presenta de un modo puntiforme delimitando zonas en las que es posible distinguir trayectos axónicos cortos que en muchos casos presentan varicosidades.

Cuando las inyecciones se efectuaron en el cortex dorsomedial las áreas de marcaje anterógrado se localizaron exclusivamente en la corteza cerebral y septum. Todas las eferencias de esta región cortical son, por otra parte, bilaterales y ocupan las mismas zonas en ambos hemisferios.

Se ha observado marcaje anterógrado en el cortex medial, cortex dorsal, septum e incluso en el propio cortex dorsomedial. Dicho marcaje ocupa zonas o bandas bien definidas. Estas mismas bandas presentan una reacción intensamente positiva cuando se aplica algún método histoquímico para la detección de acetil colinesterasas; del mismo modo, también presentan reacción positiva a este enzima las neuronas del estrato granular y la capa plexiforme interna de esta región cortical (Tineo et al., 1983, 1987). Al mismo tiempo, todas las zonas de proyección de las neuronas piramidales de los campos CA3 y CA4 también aparecen intensamente marcadas cuando se aplica

la misma técnica (Storm-Mathisen & Blackstad, 1964; Geneser-Jensen, 1972). La misma capa a todos los niveles caudales del eje anteroposterior.

4.4.1.- REFERENCIAS SOBRE EL CORTEX MEDIAL

La referencia observada desde el cortex dorsomedial sobre el cortex medial ocupa los tercios yuxtgranulares de ambas capas plexiformes y a niveles caudales al punto de inyección una estrecha banda en la porción central de la capa plexiforme externa. Las dos primeras corresponden a las observadas en otros reptiles Squamata mediante técnicas de degeneración anterógrada (Voneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Butler, 1976; Ulinski, 1976); sin embargo, en ninguno de los casos se hace referencia a la banda intermedia de los niveles caudales.

Dada la distinta intensidad del marcaje anterógrado en las distintas bandas de referencia se ha podido deducir que la proyección desde el cortex dorsomedial sobre el cortex medial esta organizada topográficamente. Los niveles rostrales del cortex dorsomedial proyectan fundamentalmente a la zona Timm negativa de la capa plexiforme interna (1/3 yuxtgranular) a lo largo de toda la extensión del eje antero-posterior, y en menor grado a la bandas intermedia de la capa plexiforme externa; mientras que los niveles caudales proyectan, fundamentalmente al 1/3 yuxtgranular de la capa

plexiforme externa a todos los niveles rostrales y a la banda intermedia de esta misma capa a todos los niveles caudales del eje anteroposterior.

Respecto a las neuronas responsables de esta proyección, se ha observado que el principal marcaje retrógrado tras inyecciones de HRP en el cortex medial se localiza en el estrato de somas, estas neuronas son además las únicas que aparecen marcadas contralateralmente, por lo que podrían ser estas las responsables de la proyección (Poch et al., 1985). Por otra parte en este estudio se ha observado también que algunas neuronas de la capa plexiforme interna del cortex dorsomedial envían su axón mediálmente, perdiéndose el mismo en el seno de las bandas de marcaje anterógrado, por lo que dichas neuronas también podrían contribuir a esta proyección.

Al igual que se señala en los estudios de degeneración esta proyección es homotópica sobre el cortex medial de ambos hemisferios (Voneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Butler, 1976; Ulinski, 1976).

Si se compara al cortex medial de reptiles Squamata con la fascia dentata del hipocampo de mamíferos, esta última región recibe únicamente proyecciones intrahipocámpicas bilaterales desde las neuronas del campo CA4, las cuales forman una banda que ocupa el 1/5 yuxtgranular del estrato molecular (Gottlieb & Cowan, 1973; Swanson et al., 1978, 1981; West et al., 1979;

Laurberg, 1979; Laurberg & Sorensen, 1981; Demeter et al., 1985).

4.4.2.- EFERENCIAS SOBRE EL CORTEX DORSAL

Un segundo grupo de fibras que parte del cortex dorsomedial sigue un curso lateral formando una banda de marcaje anterógrado en la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa que abarca las subregiones D1 y D2 del cortex dorsal tanto ipsilateral como contralateralmente. El limite lateral de la banda de eferencia coincide con el marcaje retrógrado en el estrato granular de la subregión D2 ipsilateral, por lo que las proyecciones entre el cortex dorsomedial y la subregión D2 son reciprocas.

Esta proyección no ha sido referida en ninguno de los trabajos previos sobre conexiones de reptiles con técnicas de degeneración. Sin embargo en Gekko e Iguana mediante inyecciones de HRP en el cortex dorsal se ha observado la presencia de somas neuronales marcados en el cortex dorsomedial pero sólo ipsilateralmente (Bruce & Butler, 1984a). En Podarcis y Gallotia, en cambio, el marcaje retrógrado se presenta bilateralmente.

Esta proyección parece similar a la que en mamíferos realizan las neuronas piramidales del campo CA3 a través de la llamada colateral de Schaffer. Dicha proyección es bilateral y se restringe al campo CA1 en el que forma bandas de eferencia sobre los estratos radiatum y

oriens (Ramón y Cajal, 1904; Gottlieb & Cowan, 1973; Swanson et al., 1978, 1981; Laurberg & Sorensen, 1981).

4.4.3.- REFERENCIA SOBRE EL PROPIO CORTEX DORSOMEDIAL

En todos los ejemplares en los que se administró HRP en el cortex dorsomedial se observaron somas neuronales marcados en el propio cortex dorsomedial de ambos hemisferios. En el hemisferio ipsilateral el marcaje retrógrado se presentó incluso fuera del área de difusión. Adicionalmente, en estos ejemplares se observó un marcaje de eferencias que abarcó parte de la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa de este área cortical en ambos hemisferios. En el hemisferio contralateral, el marcaje retrógrado se localizó exclusivamente en el estrato de somas, mientras que en el ipsilateral se observaron neuronas marcadas tanto en el estrato de somas como en ambas capas plexiformes.

Dos tipos neuronales aparecen marcados en la capa plexiforme externa unas se sitúan siempre en la zona Timm negativa en la cual extienden sus árboles dendríticos, mientras que otras se localizan en la zona Timm positiva.

Las neuronas localizadas en la zona Timm negativa, cuando se aplica el método de Golgi, se presenta con un plexo axónico en esta misma zona (Martínez Guijarro, 1985); adicionalmente, en las neuronas marcadas con HRP este axón presenta una trayectoria inicial descendente que se pierde

en la proximidad del estrato de somas. En estudios de inmunocitoquímica se ha observado que este tipo neuronal podría utilizar GABA como neurotransmisor (Schwerdtfeger & López García, 1986). Por último hay que señalar que este tipo neuronal se sitúa en la zona de eferencia del propio cortex dorsomedial de cuyas neuronas de proyección podría recibir contactos sinápticos.

Las neuronas marcadas en la zona Timm positiva de la capa plexiforme externa también presentan un axón descendente y muestran reacción inmunocitoquímica positiva al GABA (Lorente & Schwerdtfeger, comunicación personal).

Las neuronas marcadas en la capa plexiforme interna presentan una morfología entre triangular y fusiforme similar a alguno de los tipos neuronales de la capa plexiforme interna del cortex medial como se ha descrito en estudios con la técnica de Golgi (Lacey, 1978; Wouterlood, 1981; Berbel, 1981; Martínez Guijarro, 1985). Tanto en las observaciones con el método de Golgi como mediante marcaje con HRP, el axón presenta una trayectoria ascendente perdiéndose en el estrato de somas. Hay que señalar que estas neuronas se localizan en la zona de proyección de las fibras Timm positivas de las que reciben contactos sinápticos (Martínez Guijarro, 1985). Algunos de los tipos neuronales marcados en esta capa presentan un axón ascendente que acaba en un plexo en el estrato de somas del cortex dorsomedial. Dicha observación coincide con las realizadas con el método de Golgi (Ramón y Cajal, 1917).

Otros tipos neuronales, presentan en cambio, un axón dirigido hacia el estrato de somas del cortex medial.

Tanto las neuronas de la capa plexiforme externa como las de la interna nunca aparecen retrógradamente marcadas cuando se administra HRP en alguna de las zonas de proyección del cortex dorsomedial (Bruce & Butler, 1984a; Martínez García, 1984; Poch et al., 1985) por lo que podrían ser consideradas como interneuronas que elaboran y modulan la información de las neuronas bipiramidales o neuronas de proyección del cortex dorsomedial. De hecho, algunas de estas neuronas de las capas plexiformes han sido identificadas como GABAérgicas (Schwerdtfeger & López García, 1986) mientras que otras son acetilcolinesterasa positivas (Poch et al., 1984; Tineo et al., 1987).

Por último, las neuronas marcadas en el estrato de somas podrían corresponder al tipo bipiramidal, aunque no se descarta la posibilidad de que intercaladas entre estas pueda existir algún tipo de "neuronas de los cestos" (Martínez Guijarro et al., 1985). Las neuronas bipiramidales aparecen marcadas a lo largo de toda la extensión del cortex dorsomedial incluso en zonas muy alejadas del punto de inyección cuando este se centra en el propio cortex dorsomedial y en los niveles caudales al punto de inyección cuando esta se efectúa en el cortex dorsal.

Por otra parte cuando se efectúan inyecciones de HRP en el propio cortex dorsomedial se observa la salida de

tres grupos de axones eferentes uno de los cuales se incurva y asciende a través de la superposición medial dando lugar a una banda de eferencia sobre la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial, esta última banda de eferencia se continua con el cortex medial.

Aún cuando la comprobación real de la existencia de esta proyección, del cortex dorsomedial sobre si mismo debe ser realizada a nivel de microscopia electrónica, se pueden aportar algunos datos en favor de esta hipótesis. Por una parte, es frecuente observar en la banda de eferencia sobre el cortex dorsomedial varicosidades y engrosamientos periódicos que hacen suponer la existencia de contactos sinápticos, por otra parte, en los niveles más rostrales las fibras que dan lugar a esta banda de eferencia toman una trayectoria oblicua acabando en la propia región cortical, es decir, no se continúan con la eferencia señalada en el cortex medial.

Como se acaba de señalar en la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial donde se situa la banda de eferencia del propio cortex dorsomedial se localizan las neuronas horizontales que también aparecen retrógradamente marcadas, por lo que la proyección de las neuronas bipiramidales podría incidir tanto sobre el árbol dendrítico apical de las neuronas bipiramidales como sobre las neuronas horizontales, estableciéndose de este modo circuitos recíprocos entre

ambos tipos neuronales.

La existencia de circuitos recíprocos en el propio cortex dorsomedial no ha sido citada con anterioridad en otros reptiles. Incluso en estudios mediante técnicas de degeneración (Lohman & Mentink, 1972) se señala que la proyección desde el cortex dorsomedial sobre la capa plexiforme externa del cortex medial procede directamente desde la capa plexiforme interna desde donde los axones cruzarían directamente el estrato de somas de esta región cortical. No obstante, en los primeros estudios realizados con técnicas de Golgi (Ramón y Cajal, 1917) se describe la existencia de colaterales axónicas ascendentes que atraviesan el estrato de somas para acabar en la porción más superficial de la capa plexiforme externa del propio cortex dorsomedial.

En el hipocampo de mamíferos, por otra parte, se han descrito una serie de proyecciones intrínsecas dentro de cada subregión. De tal modo que se definen dos tipos neuronales básicos: interneuronas y neuronas de proyección. Las primeras proyectan sobre las segundas que a su vez lo hacen fuera de la propia subregión formándose de este modo circuitos de retroactivación y retroinhibición (Andersen et al., 1963; Buszaki & Eidelberg, 1982). Estos circuitos podrían estar también representados en la corteza cerebral de reptiles Squamata por las conexiones recíprocas entre las neuronas bipiramidales y las que aparecen aisladamente en las capas plexiformes. Por otra parte, también es

posible la existencia de proyecciones recíprocas entre neuronas bipiramidales en el propio cortex dorsomedial, estos tipos de conexiones han sido ya observados en el hipocampo de mamíferos entre las neuronas piramidales de la misma subregión mediante datos electrofisiológicos (Mac Vicar & Dudek, 1980).

La proyección contralateral sobre el cortex dorsomedial ya había sido observada incluso con técnicas de degeneración (Voneida & Ebbesson, 1969; Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1976; Eutler, 1976; Bruce & Butler, 1984a).

En el hipocampo de mamíferos dos son, fundamentalmente los tipos neuronales que presentan una proyección contralateral: las neuronas piramidales modificadas del campo CA4 y las neuronas piramidales del campo CA3. Sin embargo, mientras la proyección contralateral de CA4 se restringe al área dentada la de CA3 abarca tanto la propia CA3 contralateral, como CA1, localizándose la eferencia en ambos casos en los estratos radiatum y oriens (Gottlieb & Cowan, 1973; Swanson et al., 1978, 1981; Laurberg & Sorensen, 1981). La situación es similar en los reptiles Squamata ya que en ambos casos las proyecciones contralaterales se localizan fuera de la región Timm positiva.

4.4.4.- REFERENCIA SOBRE SEPTUM

La banda de referencia bilateral sobre la región septal ocupa la porción más dorsal de esta región a niveles comisurales y postcomisurales en la que no se observa producto de reacción cuando se aplica el método de Timm y que en cambio es positiva al método histoquímico de detección de acetil colinesterasas (Tineo, comunicación personal).

Esta proyección no ha sido descrita en ninguno de los estudios realizados en reptiles Squamata, únicamente en serpientes se ha señalado la existencia de una proyección similar a la descrita en el presente trabajo, pero que en este caso ocupa la mayor parte de la porción dorsal de la región septal (Ulinski, 1975). Sin embargo, en el mencionado estudio no se consiguieron inyecciones restringidas al cortex dorsomedial, por lo que la referencia descrita podría corresponder, en parte a las proyecciones de las áreas corticales adyacentes, posiblemente el cortex medial.

En mamíferos, las distintas regiones del asta de Ammon dan lugar a una proyección topográfica sobre el núcleo lateral del septum, sin embargo, mientras que la proyección desde el campo CA3 es bilateral, la procedente del campo CA1 es estrictamente ipsilateral (Siegel et al., 1974; Chronister & De France, 1979; Swanson & Cowan, 1979). Es necesario señalar que únicamente el cortex medial y el

cortex dorsomedial dan lugar, en Squamata, a una proyección bilateral sobre la región septal, restringiéndose la procedente del cortex dorsal al área latero-ventral del septum ipsilateral.

4.5.- REFERENCIAS DEL CORTEX DORSAL

A diferencia de lo señalado para el cortex dorsomedial, que al menos en lo referente a esquema de conexiones parece una región homogénea, las distintas subregiones del cortex dorsal presentan proyecciones eferentes distintas. Este hecho queda patente, sobre todo, cuando se realizan inyecciones de HRP en alguna de las áreas de proyección de esta región cortical.

Es necesario destacar que, a diferencia de lo que ocurre con el cortex dorsomedial, algunas de las proyecciones no han sido comentadas previamente en otros trabajos, del mismo modo, algunas de las referencias señaladas previamente no han sido observadas en las dos especies estudiadas; probablemente existan ambos grupos de proyecciones y tales discrepancias pueden ser atribuidas a la heterogeneidad propia de esta región cortical.

Por otra parte, en algunos casos no ha sido posible determinar que subregión del cortex dorsal da lugar a algunas referencias, ya que no ha sido posible la inyección de HRP en dichas áreas de referencia con objeto de marcar retrógradamente la subregión del cortex dorsal responsable de dicha subregión. Por ello, en primer lugar se discutirán estas referencias y posteriormente las referencias comprobadas retrógradamente de cada subregión del cortex dorsal.

4.5.1.- GENERALIDADES

Tres son las eferencias que no han podido ser determinadas mediante marcaje retrógrado, dichas eferencias son el núcleo accumbens, en núcleo dorsolateral anterior del tálamo y varios núcleos hipotalámicos.

Tras inyecciones de HRP en la porción rostral del cortex dorsal se observó marcaje anterógrado en el núcleo accumbens, sin embargo el marcaje terminal en esta región no es muy prominente. Dicha eferencia ha sido observada también en Tupinambis (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976).

En mamíferos, también se ha observado una eferencia desde el subiculum al núcleo accumbens (Swanson & Cowan, 1977; Meibach & Siegel, 1977; Groenewegen et al., 1982). Este núcleo ha sido considerado como un puente de unión entre el sistema límbico y el sistema motor recibiendo eferencias allocorticales y talámicas no específicas y proyectando a su vez con componentes del sistema extrapiramidal tales como el globus pallidus (Mogenson et al., 1980; Groenewegen & Russchen, 1984).

La proyección desde el cortex dorsal sobre el núcleo dorsolateral anterior no ha sido referida anteriormente en ningún orden de reptiles, no obstante en los primeros estudios citoarquitectónicos, mediante técnicas de impregnación argéntica, se señala la existencia de un tracto cortico-talámico que se dispersa precisamente

en el n.d.l.a. y que al igual que la ruta observada mediante transporte retrógrado es medial respecto a la stria medullaris (Ramón y Cajal, 1917). Dicha proyección abarca las dos subregiones en las que ha sido dividido este núcleo talámico.

Por otra parte, como se ha señalado anteriormente (apartado 4.2.5 de discusión) el cortex dorsal recibe una aferencia que se origina en este núcleo talámico, por lo que las proyecciones entre ambos son recíprocas formando un circuito cerrado que recuerda al circuito de Papez (Papez, 1937). Como el n.d.l.a. también proyecta sobre el cortex medial (Lohman & Van Woerden Verkley, 1978; Bruce & Butler, 1984a), este circuito cerrado se desarrolla a dos niveles:

cortex dorsal-n.d.l.a.-cortex dorsal y

cortex dorsal-n.d.l.a.-cortex medial-cortex dorsal

En mamíferos, el origen hipocámpico de la eferencia sobre los núcleos anteriores del tálamo se localiza fundamentalmente en el subiculum y en menor medida en el campo CA1 (Meibach & Siegel, 1977; Sikes et al., 1977; Schwerdtfeger, 1984).

Por último, también se ha observado una eferencia desde el cortex dorsal sobre el área dorsal hipotalámica y la porción dorsal del núcleo periventricular del hipotálamo a través del fornix precomisural; esta proyección también ha sido observada en Tupinambis mediante degeneración anterógrada (Lohman & Van Woerden Verkley, 1976), en esta especie también se ha descrito una eferencia sobre el área

lateral hipotalámica a través del fornix precomisural, sin embargo, en los ejemplares utilizados en el presente estudio, dicha proyección no ha sido observada, lo cual no implica su inexistencia dada la heterogeneidad de la región.

En mamíferos, las eferencias hipotalámicas del hipocampo se originan fundamentalmente en el subiculum, aunque también en el campo CA1 (Meibach & Siegel, 1977; Swanson & Cowan, 1977; Schwerdtfeger, 1984). Por ello se podría comparar a algunas subregiones del cortex dorsal con el subiculum o el campo CA1 del asta de Ammon del hipocampo.

4.5.2.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION MEDIAL (D1)

De los resultados observados, D1 parece ser la única subregión del cortex dorsal que presenta proyecciones bilaterales a través de la comisura paleal anterior. Tales eferencias han sido comprobadas tanto mediante transporte anterógrado como retrógrado y acaban en el cortex dorsomedial y en las subregiones D2 y D3, así como sobre la subregión D1 contralateral.

Tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial se han podido diferenciar dos tipos neuronales marcados en D1: las neuronas del "cell plate" ipsilateralmente y las piramides modificadas del estrato granular contralateralmente.

Las neuronas del "cell plate" sólo aparecen marcadas ipsilateralmente, presentando un axón que se dirige al estrato de somas del cortex dorsomedial. Este marcaje retrógrado también ha sido observado en Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a) tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial.

Por otra parte, las piramides modificadas del estrato granular aparecieron marcadas bilateralmente cuando la inyección se centró en el cortex dorsomedial, pero no cuando la inyección se restringió al cortex medial (Poch et al., 1985).

Estos hechos indican que se trata de una proyección bilateral de D1 sobre el cortex dorsomedial, lo cual esta en aparente contradicción con los resultados aportados por Bruce y Butler (1984a) según los cuales tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial los únicos somas que se marcan retrógradamente en D1 se localizan ipsilateralmente y de una manera escasa.

La eferencia de D1 sobre el cortex dorsomedial abarca, posiblemente, la totalidad de la capa plexiforme interna a niveles caudales al punto de inyección no continuandose dicho marcaje en el cortex medial, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante marcaje retrógrado (Poch et al., 1985). No obstante también se ha observado una banda de eferencia en la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa de esta región cortical.

La eferencia de D1 sobre las restantes subregiones

del cortex dorsal, en el hemisferio ipsilateral, abarca la mitad yuxtargranular de la capa plexiforme externa y la practica totalidad de la interna.

En el hemisferio contralateral la eferencia de D1 se localiza en la porción más superficial de la capa plexiforme externa tanto del cortex dorsomedial como del cortex dorsal, aunque también se han observado axones con engrosamientos periódicos entre los somas neuronales de D1 contralateral.

Los datos bibliográficos referentes a conexiones intracorticales en otros reptiles Squamata hacen escasa referencia a este tipo de proyecciones de la subregión medial, sin embargo, en Tupinambis se ha observado que parte de las conexiones comisurales proceden del cortex dorsal (Voneida & Ebbesson, 1969). En el presente estudio se ha observado que únicamente la subregión medial da lugar a proyecciones bilaterales a través de la comisura paleal anterior. Por otra parte, se han descrito somas neuronales marcados bilateralmente en el cortex dorsal tras inyecciones de HRP en el cortex dorsomedial y en la porción lateral del cortex dorsal (Bruce & Eutler, 1984a).

Al igual que la proyección del cortex dorsomedial sobre el cortex dorsal las procedentes de la subregión D1 se asemejan al sistema de colaterales de Schaffer con origen en las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo de mamíferos, dichas neuronas proyectan bilateralmente a los campos CA1 y CA4 y contralateralmente a CA3 (Ramón y Cajal,

1904; Gottlieb & Cowan, 1973; Swanson et al., 1979, 1981; Laurberg & Sorensen, 1981). Sin embargo, en mamíferos CA3 da lugar a una proyección bilateral sobre el núcleo lateral del septum, dicha conexión no ha sido observada en las dos especies de Lacertidos estudiadas.

Por último un dato nuevo aportado en el presente estudio se refiere a la eferencia de la subregión D1 sobre los bulbos olfativos principal y accesorio. En mamíferos, se ha señalado la posibilidad de una proyección similar desde el campo CA1 sobre los bulbos olfativos, aún cuando no se descarta la posibilidad de que tal aferencia tenga lugar sobre los núcleos olfativos anteriores (De Olmos et al., 1978).

4.5.3.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION INTERMEDIA (D2)

La subregión D2 del cortex dorsal presenta dos tipos de eferencias, unas sobre el cortex dorsomedial y el cortex medial y otra sobre el septum dorsal; ambas proyecciones son estrictamente ipsilaterales.

La proyección de D2 sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal, tal como se observa mediante marcaje retrógrado, tiene su origen en las neuronas piramidales del estrato de somas. Estas neuronas se localizan siempre en una posición rostral respecto al punto de inyección y en cortes transversales se presentan siempre agrupadas en las porciones más laterales de la subregión limitando con la

adyacente D3.

Las neuronas de la subregión D2 también presentaron marcaje cuando las inyecciones de HRP se efectuaron en el cortex medial (Poch et al., 1985); sin embargo, en estos casos las neuronas con producto de reacción aparecían aisladas a lo largo del estrato de somas. Incluso en los casos de inyecciones en el cortex dorsomedial con difusión al cortex medial se pudo constatar la presencia de ambos patrones de marcaje. Esta proyección esta, por lo tanto, organizada topográficamente.

En Gekko e Iguana (Bruce & Butler, 1984a) también se señala la presencia de somas retrógradamente marcados en la subregión lateral, sin embargo, no se comentó una diferenciación clara de las subregiones intermedia (D2) y lateral (D3) del cortex dorsal. Es posible, por otra parte, que en estos ejemplares, pertenecientes a familias distintas del orden Squamata, no exista una separación clara de ambas subregiones.

En las inyecciones efectuadas en la subregión D2 se observaron bandas de marcaje anterógrado en la mitad interna de la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa del cortex dorsomedial y dos bandas en la mitad externa de la capa plexiforme externa del cortex medial. Dicho modelo de eferencias se corresponde con las observadas en otros reptiles Squamata (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Butler, 1976). Sin embargo, hay que señalar que el cortex lateral da lugar

a una eferencia sobre el tercio externo de la capa plexiforme externa del cortex medial (Martinez Garcia et al., 1986) por lo que la proyección del cortex dorsal se podría restringir a la porción intermedia de esta capa plexiforme como ha sido sugerido previamente (Lohman & Van Woerden Verkley, 1976).

La eferencia de D2 sobre el septum dorsal, es estrictamente ipsilateral y ocupa la porción latero-ventral a niveles medios y rostrales y la porción dorsal a niveles caudales. Este resultado concuerda con los observados previamente en otros reptiles Squamata (Lohman & Mentink, 1972; Lohman & Van Woerden Verkley, 1976; Ulinski, 1975). Hay que señalar que el cortex dorsomedial y el cortex medial también dan lugar a una proyección septal; estas proyecciones presentan una organización topográfica de tal modo que no existe solapamiento entre ellas con excepción de la proyección dorsal que se solapa con la proveniente de la porción dorsal del cortex medial que es, a su vez, la que proyecta a la subregión intermedia del cortex dorsal (Poch et al., 1985).

En mamíferos dos regiones hipocámpicas originan proyecciones ipsilaterales sobre los núcleos laterales del septum: el campo CA3 y el complejo subicular (Siegel et al., 1974; Swanson & Cowan, 1979; Swanson et al., 1981) los cuales podrían ser comparados a la subregión D2 del cortex dorsal.

En reptiles Squamata, el septum origina eferencias

hipotalámicas sobre las áreas lateral y preóptica, así como sobre el núcleo periventricular (Hoogland et al., 1979). Por lo tanto, al igual que ocurre en aves (Krayniak & Siegel, 1978 a y b) y en mamíferos (Siegel et al., 1974, 1975; Swanson & Cowan, 1979), también en reptiles, el septum ocupa un punto clave en el funcionamiento del sistema límbico ya que recoge la información procesada en la corteza cerebral límbica y a su vez proyecta sobre el hipotálamo controlando de este modo la salida endocrina de dicho sistema.

4.5.4.- PROYECCIONES DE LA SUBREGION LATERAL (D3)

Se ha observado un modelo de conexiones distinto para las porciones rostral y caudal de la subregión lateral del cortex dorsal por lo que a continuación van a ser tratados por separado.

4.5.4.1.- Eferencias de la porción rostral

La porción rostral de D3 origina dos proyecciones distintas: sobre el cortex lateral, y sobre la porción lateral del núcleo esférico.

Cuando se inyectó HRP en los niveles rostrales del cortex dorsal se observó un marcaje similar a terminales axónicos en la subregión dorsal del cortex lateral, este marcaje se localiza en la capa plexiforme externa a lo

largo de toda la extensión rostrocaudal de la mencionada subregión; adicionalmente tras inyecciones en el cortex lateral se han observado neuronas marcadas en la porción rostral de D3 (Amiguet, 1985). Dicha proyección es recíproca ya que como se ha señalado en el apartado 4.2.3 de discusión el cortex lateral origina una proyección sobre la porción rostral de D3.

Esta proyección no ha sido referida con anterioridad en otras especies reptilianas, en cambio, en mamíferos se ha comprobado la existencia de una proyección recíproca entre área entorrinal y subiculum (Hjorth-Simonsen, 1971; Steward, 1976; Kohler et al., 1978; Wyss, 1981; Schwerdtfeger, 1984; Kohler, 1985; Van Groen, & Lopes da Silva 1986; Van Groen et al., 1986). Si se considera al cortex lateral comparable al área entorrinal en función de sus aferencias olfativas y sus eferencias sobre el cortex medial (Martínez-García et al., 1986), se tiene que considerar a la porción rostral de D3 comparable u homólogo al subiculum. Tal homología viene reforzada por el hecho de que las eferencias sobre el núcleo accumbens, n.d.l.a. e hipotálamo (comparables con las del subiculum de mamíferos) se originan fundamentalmente en los niveles rostrales donde D3 presenta su máximo desarrollo.

También se observó una eferencia desde D3 sobre la porción lateral del núcleo esférico. Como se ha señalado en el apartado 4.4.2 de este capítulo de discusión, en esta misma localización se encuentran también

las neuronas que originan una eferencia sobre la porción rostral de D3 por lo que las proyecciones entre D3 y el núcleo esférico son recíprocas.

4.5.4.2.- Eferencias de la porción caudal

En contraposición con lo observado para la porción rostral las eferencias de la porción caudal de D3 se relacionan fundamentalmente con estructuras olfativas; de tal modo que se han observado proyecciones sobre los bulbos olfativos (principal y accesorio) y porción posterior de la cresta ventricular dorsal (PDVR o núcleo amigdalino externo).

La proyección sobre los bulbos olfativos ha sido determinada mediante transporte retrógrado tras inyecciones de HRP en estas estructuras. Esta proyección no ha sido observada en ninguno de los estudios realizados en reptiles Squamata, no obstante, en los estudios de degeneración realizados en serpientes se ha observado una eferencia que procede del núcleo esférico y que acaba en las capas plexiformes granular e interna del bulbo olfativo accesorio (Halpern & Silfen, 1974; Voneida & Sligar, 1979; Halpern, 1980). Por lo que la degeneración observada podría deberse, también a la lesión de D3 caudal que se encuentra justo por encima del núcleo esférico.

En mamíferos, los bulbos olfativos reciben eferencias fundamentalmente de estructuras amigdalinas,

aunque se ha apuntado la posibilidad de que también el campo CA1 contribuya al control de la información olfativa a través de una proyección directa sobre el bulbo olfativo accesorio (De Olmos et al., 1978).

Por último, también se ha observado una proyección sobre la porción posterior de la cresta ventricular dorsal (PDUR) dicha eferencia abarca la porción latero-caudal del DVR hasta la aparición del núcleo esférico. Esta eferencia ha sido descrita también en Tupinambis (Lohman & Van Woerden Verkley, 1976) aunque en este caso el PDUR fue referido como núcleo amigdalino externo. El modelo de conexiones del PDUR no ha sido estudiado con profundidad en reptiles. Tan sólo se han observado aferencias desde el ADUR (Ulinski, 1983) y eferencias sobre el hipotálamo (Halpern & Silfen, 1974; Voneida & Sligar, 1979; Halpern, 1980). Por ello, cualquier intento de comparación de esta proyección de D3 con alguna descrita previamente en mamíferos sería mera conjetura.

4.6.- CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, junto con los aportados por otros autores permiten esbozar un modelo básico de organización de las conexiones de la corteza cerebral y su comparación con el modelo de conexiones del sistema límbico de Mamíferos y Aves.

La principal aferencia sensorial a la corteza cerebral de reptiles Squamata es la olfativa, la cual se recibe a través del cortex lateral que recibe la información directamente del bulbo olfativo principal (Halpern, 1958, Ulinski & Petersson, 1981; Martínez-García et al., 1986). El cortex lateral, a su vez, proyecta al cortex medial, cortex dorsal y posiblemente también al cortex dorsomedial (ver apartado 4.2.2). Esta proyección es comparable a la proyección del área entorrinal sobre la fascia dentata y el asta de Ammon.

Esta información olfativa es procesada en la corteza cerebral a distintos niveles: interneuronas en las propias regiones corticales, interconexiones entre las mismas y conexiones extratelencefálicas.

En el primer nivel se han detectado somas neuronales de proyección intrínseca en las áreas corticales medial, dorsomedial y subregiones D1 y D2 del cortex dorsal. Algunas de estas neuronas han sido identificadas como GABAérgicas (Schwerdtfeger & López-García, 1987). Por otra parte, al menos en el cortex dorsomedial, también han

sido observadas interconexiones entre las propias neuronas de proyección.

Las interconexiones entre las distintas áreas corticales se asemejan mucho a las conexiones intrínsecas en el hipocampo de mamíferos a través de la cascada de información fascia dentada → CA4 y CA3 → CA1 → subiculum y las vías secundarias de retroceso CA4 → fascia dentada y subiculum → CA1. En reptiles esta cascada de información se origina en el cortex medial el cual proyecta topográficamente sobre el cortex dorsomedial y el cortex dorsal mediante una eferencia Timm positiva que se asemeja al sistema de proyección de las fibras musgosas; a su vez, el funcionamiento del cortex medial esta regulado por las eferencias que sobre él emiten el cortex dorsomedial y la subregión D2 del cortex dorsal, la primera bilateral y general y la segunda ipsilateral y topográfica. A su vez el cortex dorsomedial y la subregión D1 del cortex dorsal proyectan bilateralmente sobre las subregiones D2 y D3 respectivamente.

Esta información procesada en la corteza cerebral esta a su vez sometida a control por otras estructuras límbicas, concretamente por el núcleo dorsolateral anterior del tálamo, cuerpos mamilares y por el núcleo del rafe superior. Dichas proyecciones también tienen lugar en el hipocampo de mamíferos, aunque en este caso las proyecciones sean más complejas interviniendo además otras estructuras como el locus coeruleus y el área ventral

tegmental.

Por último, la información procesada en la corteza cerebral sale de ella siendo las estructuras receptoras de esta información ya procesada: el núcleo accumbens, núcleo dorsolateral anterior del tálamo, septum e hipotálamo. Los núcleos accumbens y dorsolateral anterior reciben eferencias desde la porción rostral de la subregión D3 del cortex dorsal en virtud de lo cual se la ha comparado al subiculum. El cortex medial, cortex dorsomedial y la subregión D2 del cortex dorsal proyectan sobre el septum de un modo topográfico: los dos primeros bilateralmente y el tercero ipsilateralmente; en mamíferos también existe una proyección topográfica de los campos CA3 y CA4 sobre el septum que a su vez proyecta sobre el hipotálamo regulando la secreción de las hormonas hipofisarias, sin embargo, no proyecta la fascia dentada. Por último el cortex dorsal constituye la principal salida hipotalámica de la corteza cerebral siendo sus subregiones D2 y posiblemente D3 rostral las responsables de tales eferencias. En mamíferos, tales proyecciones corresponden al subiculum y campo CA1.

Por otra parte la porción caudal de la subregión D3 juega un papel lateral en el modelo de conexiones de la corteza cerebral, estando implicada en conexiones fundamentalmente olfativas al recibir proyecciones del núcleo esférico y proyectar a su vez a los bulbos olfativos.

CONCLUSIONES

1.- Las áreas corticales dorsomedial y dorsal reciben aferencias desde el cortex medial, cortex lateral, porción vertical del núcleo de la banda diagonal, núcleos del lecho de la comisura anterior y del fascículo prosencefálico medial, núcleo dorsolateral anterior del tálamo, cuerpos mamilares y núcleo del rafe superior.

2.- La proyección del cortex medial sobre el cortex dorsomedial y el cortex medial está organizada topográficamente y coincide por el área ocupada por los terminales axónicos Timm positivos, por lo que el cortex medial es homologable a la fascia dentada del hipocampo de mamíferos.

3.- El cortex lateral proyecta fundamentalmente sobre el cortex dorsal y, en menor medida, sobre el cortex dorsomedial. Como el cortex lateral recibe su principal proyección desde el bulbo olfativo principal, la eferencia de este área cortical sobre las áreas paleales dorsomedial y dorsal es comparable a la del área entorrinal sobre el asta de ammon y subiculum del hipocampo de mamíferos.

4.- En los núcleos del lecho de la comisura anterior y del fascículo prosencefálico medial, así como, en la porción vertical del núcleo de la banda diagonal se observaron pocas neuronas marcadas retrógradamente tras inyecciones de HRP en las áreas corticales dorsomedial y

dorsal, pero este marcaje fué constante en todos los ejemplares estudiados. La proyección desde el núcleo de la banda diagonal es comparable a la que tiene lugar en mamíferos entre el complejo septum medial-banda diagonal y el hipocampo.

5.- La pars magnocellularis del núcleo dorsolateral anterior del tálamo proyecta sobre el cortex dorsal. En inyecciones restringidas al cortex dorsomedial se observaron muy pocas neuronas marcadas en este núcleo, y en algún caso no se observó tal marcaje, por lo que posiblemente este núcleo no proyecte al cortex dorsomedial. Esta proyección es comparable a la de los núcleos anteriores talámicos sobre el hipocampo de mamíferos.

6.- Los cuerpos mamilares presentan una doble proyección sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal. Por una parte el núcleo mamilar lateral que proyecta ipsilateralmente, y por otra el núcleo supramamilar que proyecta bilateralmente. Este último núcleo no ha sido definido con anterioridad.

7.- El núcleo del rafe superior da lugar a una proyección dispersa sobre las áreas corticales dorsomedial y dorsal. La mayor parte de axones que dan lugar a esta proyección recorren el tronco cerebral por el lado contralateral pasando al ipsilateral a través de la

decusación supramamilar.

8.- El cortex dorsal recibe proyecciones específicas desde el núcleo esférico, núcleos olfativos anteriores y área triangularis del tálamo, dichas proyecciones no han sido referidas con anterioridad reptiles Squamata.

9.- El cortex dorsomedial origina eferencias bilaterales homotópicas sobre el cortex medial, cortex dorsomedial, cortex dorsal y septum.

10.- La proyección del cortex dorsomedial sobre el cortex medial está organizada topográficamente. La porción rostral proyecta sobre el 1/3 yuxtgranular de la capa plexiforme interna a todos los niveles dando lugar también a una estrecha banda intermedia en la capa plexiforme externa del cortex medial, mientras que la porción caudal da lugar además a una banda de eferencia en el 1/3 medio de la capa plexiforme externa. Esta proyección es comparable a la del hilus sobre la fascia dentada en el hipocampo de mamíferos.

11.- En el cortex dorsomedial se forman una serie de circuitos intrínsecos entre las neuronas bipiramidales del estrato de somas y las que aparecen aisladamente en ambas capas plexiformes. Estas proyecciones son similares a las que en el hipocampo tienen lugar entre las neuronas de

proyección y las interneuronas. Adicionalmente las neuronas bipiramidales también originan una proyección contralateral sobre la zona Timm negativa de la capa plexiforme externa, No se descarta la posibilidad de que existan proyecciones entre las neuronas bipiramidales del mismo hemisferio.

12.- La eferencia del cortex dorsomedial sobre el cortex dorsal abarca las subregiones medial e intermedia, las cuales, a su vez, proyectan sobre el cortex dorsomedial por lo que tienen lugar una serie de circuitos reciprocos entre ambas.

13.- El septum recibe una eferencia bilateral desde el cortex dorsomedial la cual abarca la porción más dorsal de esta región que es negativa a la técnica de Timm.

14.- El cortex dorsal es un área heterogénea de tal modo que cada subregión presenta un patrón de eferencias distinto.

15.- Se han observado proyecciones de distintas subregiones del cortex dorsal sobre el núcleo accumbens, núcleo dorsolateral anterior del tálamo y sobre el área dorsal y la porción dorsal del núcleo periventricular ambos en el hipotálamo.

16.- La subregión medial del cortex dorsal proyecta

bilateralmente a las áreas corticales dorsomedial y dorsal y sobre los bulbos olfativos principal y accesorio.

17.- La subregión intermedia presenta proyecciones estrictamente ipsilaterales sobre las áreas corticales dorsomedial y medial y sobre el septum dorsal. Esta última proyección abarca todos los niveles del eje rostro-caudal, de tal modo que en los niveles medios y rostrales ocupa la porción latero-ventral, mientras que en los niveles caudales ocupa la porción más dorsal.

18.- La porción rostral de la subregión lateral presenta proyecciones recíprocas sobre el cortex lateral y también sobre el área lateral del núcleo esférico.

19.- Por último, la porción caudal de la subregión lateral proyecta sobre la región posterior de la cresta ventricular dorsal (PDUR) y sobre los bulbos olfativos principal y accesorio.

BIBLIOGRAFIA

- Adams J.C. (1977) Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker, *Neurosci.* 2: 141-145
- Adams J.C., W.B. Warr (1976) Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injections of horseradish peroxidase into severed tracts, *J. Comp. Neurol.* 170: 107-122
- Amaral D.G. (1978) A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat, *J. Comp. Neurol.* 189: 573-592
- Amaral D.G., W.M. Cowan (1980) Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey, *J. Comp. Neurol.* 189: 573-592
- Amiguet, M. (1985) Conexiones del cortex lateral de Podarcis hispanica con la técnica de transporte retrógrado y anterógrado de peroxidasa de rábano (HRP) Tesina de Licenciatura, Universitat de Valencia
- Andersen P., T.U.P. Bliss, K.K. Skrede (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways, *Exp. Brain Res.* 13: 222-238
- Andersen P., J.C. Eccles, Y. Loyning (1963) Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of inhibitory cells and its synapses, *Nature* 198: 540-542
- Andry M.L., R.G. Northcutt (1976) Telencephalic visual responses in the lizard Gekko gecko, *Neurosci. Abstr.* 2: 176
- Beckers H.J.A., R. Platel, R. Nieuwenhuys (1971/72) Les

- aires corticales de quelques reptiles Squamates
(Lacerta viridis , Chamaleo lateralis ,
Monopeltis guentheri), Acta Morphol Neerl.-Scand.
9: 337-364
- Belekhova M.G. (1979) Neurophysiology of the forebrain,
En : C. Gans, R.G. Northcutt, P. Ulinski (eds.)
Biology of the reptilia, Academic Press, Nueva York,
pp. 287-359
- Benowitz L.I., H.J. Karten (1976) The tractus infundibuli
and afferents to the parahippocampal region of the
pigeon, Brain Res. 102: 174-180
- Berbel P.J (1981) Estudio sobre la morfologia neuronal en
el cortex medial de la corteza cerebral de Lacerta
Tesis Doctoral, Universitat Autonoma de Barcelona
- Berk M.L., R.F. Hawkin (1985) Ascending projections of the
mamillary region in the pigeon: emphasis on
telencephalic connections, J. Comp. Neurol. 239:
330-340
- Blackstad T.W., K. Bring, J. Hem, B. Jeune (1970)
Distribution of hippocampal mossy fibers in the rats.
An experimental study with silver impregnation
methods, J. Comp. Neurol. 138: 433-450
- Blackstad T.W., A. Kjaerheim (1961) Special axodendritic
synapses in the hippocampal cortex: electron and light
microscopic studies on the layer of mossy fibers, J.
Comp. Neurol. 117: 133-159
- Bruce L.L., A.B. Butler (1984a) Telencephalic connections

- in lizards I Projections to cortex, J. Comp. Neurol. 229: 585-601
- Bruce L.L., A.B. Butler (1984b) Telencephalic connections in lizards II Projections to anterior dorsal ventricular ridge, J. Comp. Neurol. 229: 602-615
- Buzsaki G. (1984) Feed forward inhibition in the hippocampal formation, Progress Neurobiol. 22: 131-153
- Buzsaki G., E. Eidelberg (1982) Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons, J. Neurophysiol. 48: 597-607
- Butler A.B. (1976) Telencephalic projections in the lizard Gekko gecko (Linnaeus). Some connections of the cortex and dorsal ventricular ridge, Brain Behav. Evol. 13: 396-417
- Butler A.B. (1980) Cytoarchitectonic and connectional organization of the Lacertilian telencephalon with comments on vertebrate forebrain evolution, En S.O.E. Ebbesson (ed.) Comparative Neurology of the Telencephalon, Plenum Press, Nueva York, pp. 297-329
- Cairney J. (1926) A general survey of the forebrain of Sphenodon punctatus, J. Comp. Neurol. 42: 255-348
- Campos-Ortega J.A. (1971) Estudio cito y mieloarquitectónico en el diencéfalo de algunos reptiles, An. Anat. 20: 221-259
- Chronister R.B., J.F. De France (1979) Organization of projection neurons of the hippocampus, Exp. Neurol.

66: 509-523

- Cherubini E., C. Rovira, Y. Ben-Ari, A. Padgen (1982) Simultaneous recording of somatic and dendritic field potentials and combined microiontophoresis in the rat Ammon's horn in situ: effects of GABA and acetyl choline, *Neurosci. Lett.* 31: 19-24
- Crosby E.C. (1917) The forebrain of Alligator mississippiensis, *J. Comp. Neurol.* 27: 325-402
- Cruce J.A.F. (1974) A cytoarchitectonic study of the diencephalon of the tegu lizard, Tupinambis nigropunctatus, *J. Comp. Neurol.* 153: 215-238
- Danscher G. (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy, *Histochem.* 71: 1-16
- Danscher G., J. Zimmer (1978) An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues, *Histochem.* 55: 27-40
- De Olmos J.S., H. Hardy, L. Heimer (1978) The afferent connections of the main and accessory bulb formations in the rat: an experimental HRP study, *J. Comp. Neurol.* 181: 213-244
- Demeter S., D.L. Rosene, G.W. Van Hoessen (1985) Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum and entorhinal and parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the

structure and organization of hippocampal commissures,
J. Comp. Neurol. 233: 30-47

Dent J.A., N.J. Galvin, B.B. Stubfield, W.M. Cowan (1983)
The mode of termination of the hypothalamic projection
to the dentate gyrus: an E M autoradiographic study,
Brain Res. 258: 1-10

Domesick U.B. (1972) Thalamic relationships of the medial
cortex in the rat. Brain Behav. Evol. 6: 457-483

Donkelaar H.J. Ten, A. Kusuma, R. De Boer Van Huizen (1980)
Cells of origin of pathways descending to the spinal
cord in some quadrupedal reptiles, J. Comp. Neurol.
192: 827-851

Donoso J.A., J.-P. Illanes, F. Samson (1977) Dimethyl
sulfoxide action on fast axoplasmic transport and
ultrastructure of vagal axons, Brain Res. 120:
287-301

Ebbesson S.O.E. (1980) The parcellation theory and its
relation to interspecific variability in brain
organization, evolutionary and ontogenetic development
and neural plasticity, Cell Tissue res. 213: 179-212

Ebbesson S.O.E. (1984) Evolution and ontogeny of neural
circuits, The Behavioral and Brain Sciences 7:
321-366

Ebbesson S.O.E., I.J. Uoneida (1969) The cytoarchitecture
of the tegu lizard Tupinambis nigropunctatus ,
Brain. Behav. Evol. 2: 431-466

Gamble H.J. (1952) An experimental study of the secondary

- olfactory connections in Lacerta viridis, J. Anat. (London) 90: 15-29
- Geneser-Jensen F.A. (1972) Distribution of acetyl choline esterase in the hippocampal region of the ginea-pig. Part 3 The dentate area, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 131: 481-495
- Goldby F., H.J. Gamble (1957) The reptilian cerebral hemispheres, Biol. Rev. 32: 383-420
- Graham R.C. Jr., M.J. Karnovsky (1965) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique, J. Histochem. Cytochem. 14: 291-302
- Gottlieb D.I., W.M. Cowan (1973) Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connections of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I The commissural connections, J. Comp. Neurol. 149: 393-422
- Gray J.A. (1977) Drug effects on fear and frustration: possible limbic site of action of minor tranquillizers, En: L. Iversen, S. Iversen, S. Snyder (eds.). Handbook of Psychopharmacology, vol. 8, Plenum Press, Nueva York, pp. 333-334
- Groenewegen H.J., P. Room, M.P. Witter, A.H.M. Lohman (1982) Cortical afferents of the nucleus accumbens in the cat studied with anterograde and retrograde transport techniques, Neuroscience 7: 977-995

- Groenewegen, H.J., F.T. Russchen (1984) Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic and mesencephalic structures: A tracing and immunohistochemical study in the cat, J. Comp. Neurol 233: 347-367
- Guirado S. (1982) Organización de la corteza telencefálica de Natrix maura (L.) y Psammodromus algirus (L.), Tesis Doctoral, Universidad de Málaga
- Habbets A.H.M.C., F.M. Lopes Da Silva, F.W. De Quartel (1980) Autoradiography of the olfactory hippocampal pathway in the cat with special reference to the perforant path, Exp. Brain Res. 38: 257-265
- Hall, J.A., R.E. Foster, F.F. Ebner, W.C. Hall (1977) Visual cortex in a reptile, the turtle (Pseudemus scripta and Crusemus picta), Brain Res. 130: 197-216
- Hall W.C., F.F. Ebner (1970) Thalamotelencephalic projections in the turtle (Pseudemus scripta), J. Comp. Neurol. 140: 101-122
- Halpern M. (1976) The efferent connections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in the snakes Thamnophis sirtalis and Thamnophis radix , J. Morphol. 150: 553-578
- Halpern M. (1980) The telencephalon of snakes, En S.O.E. Ebbesson (ed.) Comparative Neurology of the Telencephalon, Plenum Press, Nueva York, pp. 257-294
- Halpern M., R. Silfen (1974) The efferent connections of

- the nucleus sphericus in the greater snake Thamnophis sirtalis, Anat. Rec. 178: 368
- Hamlyn L.H. (1962) The fine structure of the mossy fiber endings in the hippocampus of the rabbit, J. Anat. (London) 96: 112-120
- Hansson H.-A. (1973) Uptake and intracellular bidirectional transport of horseradish peroxidase in retinal ganglion cells, Exp. Eye Res. 16: 377-388
- Haug F.-M.S. (1967) Electronmicroscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fiber synapses by a modified sulphide silver procedure, Histochemie 8: 355-368
- Haug F.-M.S. (1974) Light microscopical mapping of the hippocampal region, pyriform cortex and the corticomedial amygdaloid nuclei. I. Area dentata, hippocampus and subiculum, Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 145: 1-27
- Heimer L. (1969) The secondary olfactory connections in mammals, reptiles and sharks. Ann. N. Y. Acad. Sci. 167: 129-146
- Henkerham M. (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat, J. Comp. Neurol. 177: 589-610
- Hjorth-Simonsen A. (1971) Hippocampal efferents to the ipsilateral entorhinal area: an experimental study in the rat, J. Comp. Neurol. 142: 417-438
- Hjorth-Simonsen A. (1976) Laminar distribution and topical

- organization of intrinsic connections in the hippocampal region, *Exp. Brain Res. Suppl.* 1: 171-176
- Hoogland P.U. (1977) Efferent connections of the striatum in Tupinambis nigropunctatus, *J. Morphol.* 152: 229-246
- Hoogland P.U. (1981) Spinothalamic projections in a lizard Varanus exantimaticus. An HRP study, *J. Comp. Neurol.* 198: 7-12
- Hoogland P.U. (1982) Brainstem afferents to the thalamus in a lizard Varanus exantimaticus, *J. Comp. Neurol.* 210: 152-162
- Hoogland P.U., H.J. Ten Donkelaar, J.A.F. Cruce (1978) Efferent connections of the septal area in a lizard (Tupinambis nigropunctatus), *Neurosci. Lett.* 7: 61-65
- Hoogland P.U., W.J.A.J. Smeets, H.W.M. Steinbusch (1984) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the lizard Gekko gekko, *Neurosci. Lett. Suppl.* 18: S170
- Ibata Y., N. Otsuka (1969) Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 171-175
- Johnston J.B. (1915) The cell masses in the forebrain of the turtle Cistudo carolina, *J. Comp. Neurol.* 25: 393-468

- Johnston J.B. (1916) Evidence of a motor pallium in the forebrain of reptiles, J.Comp. Neurol. 26: 475-479
- Keefer D.A., W.B. Spatz, U. Misgeld (1976) Golgi-like staining of neocortical neurons using retrogradely transported horseradish peroxidase, Neurosci. Lett. 3: 233-237
- Ketelslegers J.M. (1969) Localization histoquimique du zinc dans le telencephale du lezard Lacerta muralis, Cellule 58: 69-75
- Kholer C. (1985) Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I The subicular complex, J. Comp. Neurol. 236: 504-522
- Kholer C., M.T. Shipley, B. Srebro, W. Harkmark (1978) Some retrohippocampal afferents to the entorhinal cortex. Cells of origin as studied by the HRP method in the rat and mouse, Neurosci. Lett. 10: 115-120
- Krayniak P.F., A. Siegel (1978a) Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeon, Brain Behav. Evol. 15: 372-388
- Krayniak P.F., A. Siegel (1978b) Efferent connections of the septal area in the pigeon, Brain Behav. Evol. 15: 389-404
- La Vail J.H., M.M. La Vail (1974) The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system. A light and electron microscopic study, J. Comp. Neurol. 157: 303-358
- Lacey D.C. (1978) The organization of the hippocampus of

- the fence lizard: A light microscopic study, J. Comp. Neurol. 182: 247-264
- Lange S.J. De (1911) Das Vorderhirn der Reptilien, Folia Neuro-Biol. (Lpz.) 5: 548-597
- Laurberg S. (1979) Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus, J. Comp. Neurol. 184: 685-708
- Laurberg S., K.E. Sorensen (1981) Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3), Brain Res. 212: 287-300
- Lohman A.H.M., P.V. Hoogland, C.J. Stoll, H.J. Groenewegen (1983) From reptiles to mammals with emphasis on the development of the so-called limbic system, Neurosci. Lett. Suppl. 14: S225
- Lohman A.H.M., G.M. Mentink (1972) Some cortical connections of the tegu lizard (Tupinambis tequixín), Brain Res. 45: 325-344
- Lohman A.H.M., I. Van Woerden Verkley (1976) Further studies on the cortical connections of the tegu lizard, Brain Res. 103: 9-28
- Lohman A.H.M., I. Van Woerden Verkley (1978) Ascending connections to the forebrain in the tegu lizard, J. Comp. Neurol. 182: 555-594
- López García C., A. Molowny, J. Pérez Clausell (1983a) Volumetric and densitometric study in the cerebral cortex of a lizard (Lacerta galloti) using the Timm method, Neurosci. Lett. 40: 13-18

- López García C., A. Molowny, J. Pérez Clausell, F.J. Martínez Guijarro (1984) A sulphide-osmium procedure for detection of metal containing synaptic boutons in the lizard cerebral cortex, *J. Neurosci. Meth.* 11: 211-220
- López García C., E. Soriano, A. Molowny, J.M. García Verdugo, P. Berbel, J. Regidor (1983b) The Timm positive system of axonic terminals of the cerebral cortex of Lacerta, *En*: Grisolia, Guerri, Samson, Norton, Reinoso-Suarez (eds.), *Ramón y Cajal's Contribution to Neurosciences*, Elsevier, Amsterdam, pp. 137-148
- Lorente de Nó R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system, *J. Psychol. Neurol. (Leipzig)* 46: 113-177
- MacVicar B.A., F.E. Dudek (1980) Local synaptic circuits in rat hippocampus: interactions between pyramidal cells, *Brain Res.* 184: 220-223
- Martínez García F. (1984) Estudio de las aferencias al área dorsal de la corteza cerebral de la lagartija común Podarcis hispanica (Steind, 1870) con la técnica de transporte retrógrado de HRP (peroxidasa de rábano), Tesina de licenciatura, Universitat de Valencia
- Martínez García F., M. Amiguet, F. Olucha, C. López García (1986) Connections of the lateral cortex in the lizard Podarcis hispanica, *Neurosci. Lett.* 63: 39-44

- Martínez Guijarro F.J. (1985) Organización de las áreas dorsomedial y dorsal de la corteza cerebral de Podarcis hispanica (Steindachner, 1870), Tesis doctoral, Universitat de Valencia
- Martínez Guijarro F.J., P.J. Berbel, A. Molowny, C. López García (1984a) Apical dendritic spines and axonic terminals in the bipyramidal neurons of the dorsomedial cortex of lizards (Lacerta), Anat. Embryol. 170: 321-326
- Martínez Guijarro F.J., C. López García, F. Olucha, A. Molowny, J. Pérez Clausell (1984b) The medial cortex projection to the Timm positive areas of the cerebral cortex of lizards, Neurosci. Lett. Suppl. 14: S47
- Meibach R.C., A. Siegel (1977) Efferent connections of the hippocampal formation in the rat, Brain. Res. 124: 197-224
- Mesulam M.-M. (1978) Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase: a non carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing afferents and efferents, J. Histochem. Cytochem. 26: 106-117
- Mesulam M.-M. (1982) Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways-axonal transport. Enzyme histochemistry and light microscopic analysis, En M.-M. Mesulam (ed.) Tracing neural pathways with horseradish peroxidase, John Wiley and Sons, Bath, pp. 1-152

- Mesulam M.-M., E.J. Mufson (1980) The rapid anterograde transport of horseradish peroxidase, *Neurosci.* 5: 1277-1286
- Mesulam M.-M., D.G. Rosene (1979) Sensitivity in horseradish peroxidase: a comparative and quantitative analysis of nine methods, *J. Histochem. Cytochem.* 27: 763-773
- Mogenson G.J., D.L. Jones, C.Y. Yim (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic and the motor system, *Prog. Neurobiol.* 14: 69-97
- Molowny A. (1980) Estudio de la corteza cerebral de Lacerta y otros reptiles con la técnica de Timm, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna
- Molowny A., C. López García (1978) Estudio citoarquitectónico de la corteza cerebral de reptiles. III Localización histoquímica de metales pesados y definición de subregiones Timm positivas en la corteza de Lacerta, Chalcides, Tarentola y Malpolon, *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.* 70: 55-74
- Moore R.Y., A.E. Halaris (1975) Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat, *J. Comp. Neurol.* 164: 171-184
- Morrell J.I., L.M. Greenberger, D.W. Pfaff (1981) Comparison of horseradish peroxidase visualization methods: quantitative results and further technical specifics, *J. Histochem. Cytochem.* 29: 903-916
- Nauta W.J.H., H.J. Karten (1970) A general profile of the

- vertebrate brain with sidlights on the ancestry of cerebral cortex, En : F.O. Schmidt (ed.), Neuroscience: Second Study Program, Rockefeller University Press, Nueva York, pp. 7-26
- Neary I.J. (1984) Aterior thalamic nucleus projects to the dorsal pallium in ranid frogs, Neurosci. Lett. 51: 213-219
- Northcutt R.G. (1967) Architectonic studies of the telencephalon of Iguana iguana, J. Comp. Neurol. 130: 109-148
- Northcutt R.G. (1978) Forebrain and midbrain organization in lizards and its phylogenetic significance. En : N. Greenberg, P.D. McLean (eds.) Behavior and Neurobiology of Lizards, Rockville NIH, pp. 11-64
- Olsson Y., B. Arvidson, M. Hartman, A. Peterson, C. Tengvar (1983) Horseradish peroxidase histochemistry. A comparison between various methods used for identifying neurons labeled by retrograde axonal transport, J. Neurosci. Meth. 7: 49-54
- Olucha F., F. Martínez García, C. López García (1985a) A new stabilizing agent for the tetramethyl benzidine (TMB) reaction product in the histochemical detection of horseradish peroxidase (HRP), J. Neurosci. Meth. 13: 131-138
- Olucha F., L. Poch, F. Martínez García, M. Amiguet (1985b) Organización de proyecciones corticales del cortex dorsomedial de dos Lacertidos: Podarcis hispanica

- y Gallotia stehlinii, I Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Madrid, Noviembre 1985
- Olucha F., L. Poch, F. Martínez García, C. López García, W. Schewerdtfeger (1986) Efferent projections of the medial cortex of the lizards Podarcis hispanica and Gallotia stehlinii, Anat. Embryol. (enviado)
- Quimet C.C., R.L. Patrick, F.F. Ebner (1985) The projection of three extrathalamic cell groups to the cerebral cortex of the turtle Pseudemus, J. Comp. Neurol. 237: 77-84
- Papez J.W. (1937) A proposed mechanism of emotion, Arch. Neurol. Psychiatr. 38: 725-743
- Parent A., L.J. Poirier (1971) Occurrence and distribution of monoamine-containing neurons in the brain of the painted turtle Chrysemys picta, J. Anat. (London) 110: 81-89
- Parent A., D. Poitras, L. Dubé (1981) Comparative anatomy of central monoaminergic systems, En: Björklund, Hokfelt (eds.) Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 2, Classical Transmitters in the CNS, Elsevier, Amsterdam, pp. 409-434
- Pasquier D.A., F. Reinoso-Suarez (1976) Direct projections from hypothalamus to hippocampus in the rat demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase, Brain Res. 108: 165-169
- Pasquier D.A., F. Reinoso-Suarez (1977) Differential efferent connections of the brain stem to the

- hippocampus, Brain Res. 120: 540-548
- Pasquier D.A., F. Reinoso-Suarez (1978) The topographic organization of hypothalamic and brain stem projections to the hippocampus, Brain Res. Bull. 3: 373-389
- Pérez-Clausell J., G. Danscher (1985) Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study, Brain Res. 33: 91-98
- Pérez-Clausell J., A. Molowny, C. López García (1985) Histochemical localization of heavy metals in the brain of reptiles, Neurosci. Lett. Suppl. 22: S548
- Poch L., F. Olucha, F. Martínez García, M. Amiguet, J. Regidor (1985) Estratificación de las aferencias corticales sobre el cortex medial de dos Lacertidos: Podarcis hispanica y Gallotia stehlinii, I Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Madrid, Noviembre 1985
- Price J.L., P.J. Powell (1971) Certain observations on the olfactory pathway, J. Anat. 110: 105-126
- Quiroga J.C. (1979) The cell masses in the diencephalon of Amphisbaena darwini heterozonata Burmeister (Amphisbaena, Squamata, Reptilia)
- Ramón y Cajal P. (1917) Nuevo estudio del encéfalo de reptiles I, Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid 15: 83-99
- Ramón y Cajal S. (1904) Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados, N. Moya, Madrid

- Regidor J. (1977) Tipología neuronal y organización de la corteza cerebral de Lacerta galloti. Estudio con los métodos de Golgi, Tesis Doctoral, Univ. La Laguna
- Regidor J., L. Poch, P. Tineo, C. López García (1984) AChE pattern in the cerebral cortex of Gallotia simonui stehlinii (Sauria, Lacertidae), Neurosci. Lett. Suppl. 18: S50
- Reperant J. (1976) Afferences et efferences telencephaliques du cortex dorsal de la vipere (Vipera aspis L.). Donnes preliminaires, C. R. Acad. Sc. Paris 283: 809-812
- Riss W., M. Halpern, F. Scalia (1969) The quest for clues to forebrain evolution - the study of reptiles, Brain Behav. Evol. 2: 1-50
- Ruth R.E., T.J. Collier, A. Routtenberg (1982) Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I medial and intermediate entorhinal projecting cells, J. Comp. Neurol. 209: 69-78
- Schwerdtfeger W.K. (1984) Structure and fiber connections of the hippocampus: A comparative study, Springer-Verlag, Berlin
- Schwerdtfeger W.K. (1986a) Afferent fibers from the septum terminate on gamma-aminobutyric acid (GABA) interneurons and granule cells in the area dentata of the rat, Experientia 42: 392-394
- Schwerdtfeger W.K. (1986b) Septal afferents to the area

- dentata terminate on vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactive non-pyramidal neurons. An electron-microscopic immunocytochemical degeneration study in the rat, *Cell Tissue Res.* 244: 235-238
- Schwerdtfeger W.K., C. López García (1986) GABAergic neurons in the cerebral cortex of the brain of a lizard (Podarcis hispanica), *Neurosci. Lett.* 68: 117-121
- Segal M. (1979) A potent inhibitory monosynaptic hypothalamo-hippocampal connection, *Brain Res.* 162: 137-141
- Segal M., S. Landis (1974) Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase, *Brain Res.* 78: 1-15
- Shipley M.T., K.E. Sorensen (1975) On the laminar organization of the anterio-thalamic projections to the presubiculum in the ginea pig, *Brain Res.* 86: 473-477
- Siegel A., H. Edinger, S.L. Ohgami (1974) The topographic organization of the hippocampal projection to the septal area: A comparative neuroanatomical analysis in the gerbil, rat, rabbit and cat, *J. Comp. Neurol.* 157: 359-378
- Siegel A., S. Ohgami, H. Edinger (1975) Projections of the hippocampus to the septum in the squirrel monkey, *Brain Res.* 99: 247-260

- Sikes R.W., R.B. Chronister, L.E. White Jr. (1977) Origen of the hippocampus-anterior thalamic bundle in the rat: a combined horseradish peroxidase-golgi analysis, Exp. Neurol. 57: 379-395
- Soriano E. (1980) Variante de la técnica de Timm en microscopia electrónica. Estudio de la corteza cerebral y septum en Lacerta, Tesina de Licenciatura, Univ. Autónoma de Barcelona
- Stanfield B.B., W.M. Cowan (1984) An EM autoradiographic study of the hypothalamo-hippocampal projection, Brain Res. 309: 299-307
- Steward O. (1976) Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat, J. Comp. Neurol. 169: 347-360
- Storm-Mathiesen J., T. Blackstad (1964) Cholinesterase in the hippocampal region. Distribution and relation to architectonics and afferent systems, Acta Anat. (Basel) 56: 216-253
- Subhedar N., N.S. Rama Krishna (1984) A Golgi-type study of the hypothalamus of the lizard Calotes versicolor, Cell Tissue Res. 244: 235-238
- Swanson L.W., W.M. Cowan (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat, J. Comp. Neurol. 172: 49-84
- Swanson L.W., W.M. Cowan (1979) The connections of the

septal region in the rat, J. Comp. Neurol. 186:
621-656

Swanson L.W., P.E. Sawchenko, W.M. Cowan (1981) Evidence
for collateral projections by neurons in ammon's horn,
the dentate gyrus and the subiculum: a multiple
retrograde labeling study in the rat, J. Neurosci. 1:
548-559

Swanson L.W., J.M. Wyss, W.M. Cowan (1978) An
autoradiographic study of intrahippocampal association
pathways in the rat, J. Comp. Neurol. 181: 681-716

Timm F. (1958a) Zur histochemie der schwermetalle. Das
sulfid-silver-verfahren, Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.
46: 706-711

Timm F. (1958b) Zur histochemie des Ammonshorngebietes, Z.
Zellforsch. 48: 548-555

Tineo P., C. López Garcia, J.M.G. Verdugo, F.J.M. Guijarro,
F. Olucha, A. Molowny (1983) Stratification in the
cerebral cortex of Lacerta galloti, Neurosci.
Lett. Suppl. 14: S373

Turner P.T., A.B. Harris (1974) Ultrastructure of exogenous
peroxidase in cerebral cortex, Brain Res. 74: 305-326

Ueda S., Y. Takenchi, Y. Sano (1983) Immunohistochemical
demonstration of serotonin neurons in the central
nervous system of the turtle (Clemus japonica)
Anat. Embryol. 168: 1-19

Ulinski P.S. (1974) Cytoarchitecture of the cerebral cortex
in snakes, J. Comp. Neurol. 158: 243-266

- Ulinski P.S. (1975) Cortico-septal projections in the snakes Natrix sipedon and Thamnophis sirtalis, J. Comp. Neurol. 164: 375-388
- Ulinski P.S. (1976) Intracortical connections in the snakes Natrix sipedon and Thamnophis sirtalis, J. Morphol. 150: 463-484
- Ulinski P.S. (1983) Dorsal Ventricular Ridge: A treatise on forebrain organization in reptiles and birds, John Wiley and sons, Nueva York
- Ulinski P.S. (1986) Organization of cortico-geniculate projections in the turtle Pseudemus scripta, J. Comp. Neurol. 254: 529-542
- Ulinski P.S., D.A. Kanarek (1973) Cytoarchitecture of nucleus sphericus in the common boa, Constrictor constrictor, J. Comp. Neurol. 151: 159-174
- Ulinski P.S., E.H. Peterson (1981) Patterns of olfactory projections in the desert iguana Dipsosaurus dorsalis, J. Morphol. 168: 189-227
- Unger L. (1906) Untersuchungen über die Morphologie und Faserung des Reptilengehirns. I Das Vorderhirn des Geckos, Anat. Hefte 31: 273-348
- Van Groen Th., F.H. Lopes Da Silva (1986) The organization of the reciprocal connections between the subiculum and the entorhinal cortex. Part II An electrophysiological study, J. Comp. Neurol. (en prensa)
- Van Groen Th., F.J. Van Haren, M.P. Witter, H.J.

Groenewegen (1986) The organization of the reciprocal connections between the subiculum and the entorhinal cortex in the cat. Part I A neuroanatomical study, J. Comp. Neurol. (en prensa)

Voneida T.J., S.O.E. Ebbesson (1969) On the origin and distribution of axons in the pallial commissures in the tegu lizard (Tupinambis nigropunctatus), Brain Behav. Evol. 2: 467-481

Voneida T.J., C.M. Sligar (1979) Efferent projections of the dorsal ventricular ridge and the striatum in the tegu lizard Tupinambis nigropunctatus, J. Comp. Neurol. 186: 43-64

Werner J., A. Bienek (1985) The significance of nucleus raphe dorsalis and centralis for thermoafferent signal transmission to the preoptic area of the rat, Exp. Brain Res. 59: 543-547

West J.R., H.O. Nornes, C.L. Barnes, M. Bronfenbrenner (1979) The cells of origin of the commissural afferents to the area dentata in the mouse, Brain Res. 160: 203-216

Wicht H., W. Himstedt (1986) Two thalamo-telencephalic pathways in a urodele, Triturus alpestris, Neurosci. Lett. 68: 90-94

Winocur G. (1980) The hippocampus and cue utilization, Physiol. Psychol. 8: 280-288

Wolters J.G., H.J. Ten Donkelaar, H.W.M. Steinbush, A.A.J. Verhofstad (1985) Distribution of serotonin in the

brain stem and spinal cord of the lizard Varanus exanthematicus : An immunohistochemical study, *Neursoci.* 14: 169-193

Wouterlood F.G. (1981) The structure of the mediodorsal cerebral cortex in the lizard Agama agama : A golgi study, *J. Comp. Neurol.* 196: 443-458

Wyss J.M. (1981) An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat, *J. Comp. Neurol.* 199: 495-512

Wyss J.M., L.W. Swanson, W.M. Cowan (1979) A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat, *Neurosci.* 4: 463-476

Zimmer J., F.-M.S. Haug (1978) Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats observed with the Timm sulphide silver method, *J. Comp. Neurol.* 179: 581-618



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. FRANCISCO OLIVERA BORDONAV
la calificación de APTO CUM LAUDE

Valencia, a 5 de NOVIEMBRE de 1987

El Secretario,

El Presidente

